

**Vergleich der Spiegel von Knorpel- und Knochen-
degradationsmarkern (Pyridiniumcrosslinks und COMP) mit den
Spiegeln der Advanced Glycation Endproducts (Pentosidin und CML)
in der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae

(Dr. med.)

vorgelegt

dem Rat der Medizinischen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Christiane Scharf

geboren am 03.12.1983 in Gera

Gutachter:

1. Prof. Dr. G. Hein, Jena.....
2. Prof. Dr. R. Bräuer, Jena.....
3. Prof. Dr. C. Baerwald, Leipzig.....

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.05.2010

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ACR	American College of Rheumatology
ADAMTS	A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin motifs
AGE	Advanced Glycation Endproduct
AGE-R	AGE-Rezeptor
AK	Antikörper
ALE	Advanced Lipoxidation Endproduct
Anti-CCP-AK	Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody
Bi-BSA-AGE	Biotinyliertes glyciertes Bovines Serum-Albumin
BSA	Bovines Serum-Albumin
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CCP	Cyclisches Citrulliniertes Peptid
CD	Cluster of Differentiation
CML	N-ε-Carboxymethyl-Lysin
CMV	Zytomegalievirus
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
DMARD	Disease Modifying Antirheumatic Drugs
DNA	Desoxyribonucleinacid
DPyd	Desoxypyridinolin
DXA	Dual X-ray Absorptiometry
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
EZM	Extrazellularmatrix
FasL	Fas-Ligand
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLICE	Fas-associated death domain-Like Interleukin-1β Converting Enzyme

FLIP	FLICE Inhibitory Protein
fmol	Femtomol
g	Gramm
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
HCl	Salzsäure
HFBA	Heptafluorobuttersäure
HLA	Human Leukocyte Antigen
HMGB	High-Mobility-Group-Box
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1RA	IL-1 Rezeptor Antagonist
I- κ B	Inhibitorprotein für NF- κ B
kDa	Kilodalton
l	Liter
LDL	Low Density Lipoprotein
MAK	monoklonaler Antikörper
MCP	Metacarpophalangealgelenk
M-CSF	Macrophage-Colony-Stimulating Factor
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	Multipotential Stem Cells
MTP	Metatarsophalangealgelenk
n	Stichprobenumfang
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
OA	Osteoarthrose

OCIF	Osteoclastogenesis Inhibitory Factor (syn. OPG)
ODAR	Osteoclast Differentiation and Activation factor
ODF	Osteoclast Differentiation Factor
OPG(L)	Osteoprotegerin (Ligand)
p	Signifikanz
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate Buffered Saline
PIP	Proximales Interphalangealgelenk
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
PTPN22	Protein Tyrosin Phosphatase Non-receptor Type 22
Pyd	Pyridinolin
r	Korrelationskoeffizient nach Spearman
RA	Rheumatoide Arthritis
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
(s)RANK(L)	(soluble) Receptor Activator of NF- κ B (Ligand)
RA-SF	RA-synoviale Fibroblasten
RF	Rheumafaktor
(m)RNA	(messenger) Ribonucleinacid
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
ScR	Scavanger Rezeptor
SE	Shared Epitope
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
TGF	Transforming (tumor) Growth Factor
Th	T-Helferzellen
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TNF(R)	Tumor Necrosis Factor (Receptor)
TRANCE	TNF-Related Activation-induced Cytokine (syn. RANKL)
Treg	regulatorische T-Zellen
U/l	Units pro Liter
U/min	Umdrehung pro Minute
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
W	Tryptophan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	IV
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Rheumatoide Arthritis (RA)	3
2.1.1 Historisches.....	3
2.1.2 Definition	3
2.1.3 Epidemiologie.....	4
2.1.4 Ätiopathogenese.....	4
2.1.4.1 Genetik und Umwelt.....	4
2.1.4.2 Immunprozesse / T- und B-Zellen	5
2.1.4.3 Fibroblasten.....	9
2.1.4.4 Zytokine	11
2.1.4.5 Osteoklasten.....	11
2.1.5 Klinische Kennzeichen	14
2.1.6 Diagnose	17
2.1.7 Therapie	20
2.2 Kollagen und Abbaumarker von Knorpel und Knochen	24
2.2.1 Die Extrazelluläre Matrix	24
2.2.2 Kollagen-Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin.....	26
2.2.3 Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP)	29
2.3 Advanced Glycation Endproducts (AGEs).....	31
2.3.1 Begriff und Historie	31
2.3.2 Biochemie	32
2.3.3 AGEs und Rezeptorinteraktion	34
2.3.4 AGEs und Erkrankungen	35
2.3.5 AGEs und RA	37
3 Ziele der Arbeit	40

4 Material und Methoden.....	41
4.1 Patientenkollektiv	41
4.2 Material.....	41
4.3 Bestimmung der Crosslinks Pyd, DPyd und des COMP	42
4.3.1 Pyd und DPyd	42
4.3.2 COMP	44
4.4 Bestimmung der AGEs Pentosidin und CML.....	44
4.4.1 Pentosidin.....	44
4.4.2 N-ε-Carboxymethyl-Lysin (CML).....	46
4.5 Bestimmung des Gesamtproteins.....	48
4.6 Auswertung und Statistik.....	48
5 Ergebnisse.....	49
5.1 Messergebnisse der natürlichen Crosslinks und des COMP	49
5.1.1 Deskriptive Statistik.....	49
5.1.2 Test auf Normalverteilung	49
5.1.3 Korrelationsanalyse der Abbaumarker	51
5.2 Messergebnisse der AGEs	53
5.2.1 Deskriptive Statistik.....	53
5.2.2 Test auf Normalverteilung	55
5.2.3 Korrelationsanalyse der AGEs.....	55
5.3 Zusammenhang zwischen den Abbaumarkern und den AGEs.....	56
5.4 Altersabhängigkeit der Werte	60
5.4.1 Altersabhängigkeit der natürlichen Crosslinks und des COMP	60
5.4.2 Altersabhängigkeit der AGEs	61
5.5 Unterschiede der Ergebnisse unter den Geschlechtern.....	62
5.5.1 Deskriptive Statistik.....	62
5.5.2 Normalverteilung	65
5.5.3 Korrelationsanalyse	66
6 Diskussion	71
6.1 Beziehungen zwischen Abbaumarkern und AGEs	72
6.2 Die Beziehungen der Abbaumarker untereinander.....	82

6.3 Die Beziehungen der AGEs untereinander	85
6.4 Einfluss des Alters	86
6.5 Einfluss des Geschlechtes	88
7 Schlussfolgerung	91
8 Literatur- und Quellenverzeichnis	93
9 Anhang	111
9.1 Lebenslauf.....	111
9.2 Danksagung	112
9.3 Ehrenwörtliche Erklärung	113

1 Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische Systemerkrankung mit bevorzugtem Befall der peripheren Gelenke. Dabei führen letztendlich Synovialisproliferation sowie involvierte Immunphänomene über Zytokinkaskaden und Enzymaktivierung zu Knorpel- und Knochenarrosionen. Daraus resultieren Funktionseinschränkungen bzw. Funktionsverlust der betroffenen Gelenke mit chronischen Schmerzen, wodurch die Lebensqualität der Patienten enorm eingeschränkt wird. Die Pathogenese und Ätiologie dieser Erkrankung ist noch unverstanden, auch wenn es zahlreiche verschiedene Erklärungsansätze gibt. Für eine frühe Diagnostik und Therapie ist es hilfreich, möglichst viel über die Mechanismen der Krankheitsentstehung zu wissen.

Seit längerer Zeit werden verschiedene Abbaumarker der Gelenkmatrix untersucht, von denen den Kollagen-Crosslinks Pyridinolin (Pyd) und Desoxypyridinolin (DPyd), sowie dem nichtkollagenen Knorpelmatrix-Protein COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) eine große Bedeutung beigemessen wird. DPyd gilt als relativ spezifischer Marker des Knochenabbaus (Kollagen I), Pyd hingegen kommt neben dem Knochen vor allem im Knorpel (Kollagen II) vor und gilt demnach vorrangig in Relation zu DPyd als Abbaumarker der Knorpelmatrix, genau wie COMP.

Die AGEs (Advanced Glycation Endproducts) entstehen bei der RA vor allem unter oxidativem Stress und stellen Proteinmodifizierungen dar, denen bei der Erkrankung ein erhebliches pathogenetisches Potential zugesprochen wird. Durch nicht-enzymatische Glykierungsreaktionen tragen sie zur Quervernetzung von Proteinen bei und sind in der Lage, die physikochemischen Eigenschaften des Gewebes zu verändern. Zu den am besten untersuchten AGEs zählen Pentosidin und N-ε-Carboxymethyl-Lysin (CML).

Primäres Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, den Zusammenhang der AGEs Pentosidin und CML und der Abbaumarker Pyd, DPyd und COMP „nahe am Ort des Geschehens“, in der Synovialflüssigkeit, bei RA-Patienten zu untersuchen.

Dafür wurden die Pyd-, DPyd- und Pentosidin-Werte mit Hilfe einer HPLC-Methode bestimmt. Zur Quantifizierung der COMP- und CML-Spiegel standen ELISA-Systeme zur Verfügung.

Bei den Abbaumarkern ließen sich untereinander Zusammenhänge herstellen. Die signifikant positiven Korrelationen Pyd – COMP und Pyd/DPyd – COMP lassen ein gleichsinniges Verhalten der Parameter bei dem pathologisch gesteigerten Abbau

vorrangig von Knorpel vermuten. Keine Beziehungen fanden sich zwischen den beiden AGEs, was auf unterschiedliche Bildungs- oder Eliminationswege schließen lässt.

Allerdings zeigten sich Zusammenhänge zwischen den AGEs Pentosidin und CML mit den Kollagen-Crosslinks. Statistisch signifikant positive Korrelationen ergaben sich zwischen Pentosidin und Pyd sowie dem proteinbezogenen Pentosidin und Pyd. Dies zeigt, dass erhöhte AGE-Modifikationen von Kollagenen einen vermehrten Knorpel- und Knochenkatabolismus bedingen können. Die ebenfalls signifikant positive Korrelation Pentosidin – DPyd und die signifikant negative Korrelation CML – Pyd/DPyd-Quotient bestätigen die Hypothese und lassen vermuten, dass vor allem der Knochenabbau durch diese Mechanismen betroffen ist. Denkbar wäre eine Beeinflussung des zentralen Regulators des Knochenstoffwechsels, des RANK/RANKL/OPG-Systems, durch die AGEs. Durch eine RANKL-vermittelte Aktivierung von Osteoklasten kann ein erhöhter Knochenabbau resultieren. Die auftretende Osteoporose bei der RA könnte diese Mechanismen mit zur Grundlage haben. Keine Korrelationen ergaben sich zwischen den AGEs und COMP.

Bei der Analyse des Alterseinflusses zeigte sich nur bei Pyd eine signifikant positive Korrelation mit dem Alter. Die übrigen Degradationsparameter und die AGEs ließen keine Beziehungen mit dem Lebensalter erkennen.

Bei der Analyse der Parameter getrennt nach Geschlecht zeigten sich zwar tendenziell höhere Werte bei den männlichen Patienten, signifikant waren die Unterschiede aber nicht. Die im Gesamtkollektiv gefundenen Korrelationen ließen sich in der Gruppe der weiblichen Patienten reproduzieren, allerdings nicht bei den Männern. Fraglich ist jedoch, ob hier das Geschlecht wirklich Ursache der Unterschiede oder nicht vielmehr die Anzahl der Probanden für eine saubere statistische Analyse zu gering war.

Ausgehend von unserer Zielstellung ließen sich in der vorliegenden Untersuchung signifikante Korrelationen der AGE-Spiegel Pentosidin und CML mit den Kollagenabbaumarkern nachweisen. Die Daten geben einen Beleg dafür, dass synoviale Proteine, die durch AGEs modifiziert wurden, einen Einfluss auf die Intensität der Knorpel- und Knochendestruktion nehmen können. Das zeigt die pathogenetische Relevanz der AGE-modifizierten Proteine für die RA speziell für die Destruktionsprozesse, die im Verlauf der Erkrankung auftreten. Damit eröffnen sich eventuell neue Therapieoptionen.

2 Einleitung

2.1 Rheumatoide Arthritis (RA)

2.1.1 Historisches

Bereits 1679 verfasste Thomas Sydenham eine Abhandlung über Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises und beschrieb charakteristische Gelenkveränderungen sowie chronisch intermittierende episodische Verläufe. Die erste detaillierte Fallbeschreibung der RA findet sich in der Dissertation des französischen Medizinstudenten Augustin Jacob Landré-Beauvais aus dem Jahr 1800. Es handelt sich um eine Frau, die im Alter von 20 Jahren an Schmerzen, Schwellungen und Bewegungseinschränkungen der kleinen und großen Gelenke erkrankt. Nach einigen Jahren waren die Gelenkdeformitäten so stark, dass sie nur noch 2 Finger an jeder Hand benutzen und mühsam aus dem Bett aufstehen konnte. (Short 1974)

Unsichere Dokumentationen des Krankheitsbildes findet man bei Hippokrates, Galen und Erasmus von Rotterdam. Europäische und nordafrikanische Skelettbefunde des Altertums zeigen keine Anzeichen der Erkrankung, demgegenüber sind die Knochenfunde von archaischen nordamerikanischen Indianern sehr eindrücklich. (Aceves-Avila et al. 1998, Rothschild et al. 1992)

Der Begriff „rheumatoid arthritis“ wurde 1859 von Alfred Garrod geprägt. Er unterschied die Erkrankung damit von den damals gut bekannten Arthritisformen rheumatisches Fieber und Gicht, trennte sie jedoch noch nicht von der Osteoarthritis. 1957 charakterisierte Charles Short die RA definitiv und unterschied sie klar von anderen rheumatischen Erkrankungen. (Firestein 2003)

Im deutschsprachigen Raum wird heute noch der Terminus „chronische Polyarthritis“ synonym für „Rheumatoide Arthritis“ verwendet.

2.1.2 Definition

Die Rheumatoide Arthritis ist eine typischerweise chronisch verlaufende, entzündliche Systemerkrankung. Sie manifestiert sich vordergründig als periphere symmetrische Polyarthritis, die sich zentripetal ausbreitet. Der Prozess nimmt seinen Ausgang häufig von der Synovialmembran kleiner Gelenke und kann fakultativ zu extraartikulärer Organbeteiligung führen.

Der Verlauf ist letztlich überwiegend destruierend, häufig schubweise progredient und kann zu erheblichen funktionellen Defiziten bis hin zur Invalidität führen.

2.1.3 Epidemiologie

Die Prävalenz beträgt weltweit ca. 0,5-1 % (Gabriel 2001) und nimmt mit steigendem Alter zu. Frauen sind im Verhältnis 2-3 : 1 häufiger betroffen als Männer. Die Inzidenz liegt bei etwa 30-300/100.000 Einwohnern. Sie ist bei der RA nicht nur geschlechtsabhängig, sondern ändert sich auch mit dem Lebensalter (Gabriel et al. 1999). Bei Frauen steigt sie bis zum 45. Lebensjahr, erreicht dann ein Plateau bis zum ca. 80. Lebensjahr und fällt danach wieder ab. Bei den Männern ist die Inzidenz bis zum 45. Jahr niedrig, danach verzeichnet sie einen Anstieg mit zunehmendem Alter (Symmons et al. 1994). Die Erkrankung kann sich in jedem Alter manifestieren, bevorzugt aber im vierten bis sechsten Lebensjahrzehnt. Es besteht eine familiäre Häufung mit einer Konkordanzrate von 30 % bei monozygoten und 7 % bei heterozygoten Zwillingen (Bernhard und Villiger 2001).

2.1.4 Ätiopathogenese

Die genaue Ätiologie und Pathogenese der RA ist bislang unklar. Die Krankheit wird durch lokale und systemische Entzündungsreaktionen, Immunphänomene, lokale Knorpelarrosionen und gelenknahe Knochendestruktionen (z.T. auch systemische Störung des Knochenremodeling mit der Folge einer systemischen Osteopenie) charakterisiert (Hein et al. 1995).

Man geht heute von einer multifaktoriellen Genese aus, bei der genetische, antigenspezifische und unspezifische Immunprozesse, sowie Umweltfaktoren ursächlich zusammenwirken (Klareskog et al. 2006a).

2.1.4.1 Genetik und Umwelt

Dass genetische Faktoren eine Rolle spielen, zeigt sich in der familiären Häufung und der Assoziation mit bestimmten HLA-Klasse-II-Molekülen. So werden die Oberflächenantigene HLA-DR4 (vor allem HLA DRB1*0401, *0404) und HLA-DR1 (vor allem HLA DRB1*0101) bei Erkrankten häufiger nachgewiesen. Die Aufgabe dieser Moleküle ist die Präsentation von Antigenen für T-Zellen, sowohl im peripheren Immunsystem als auch bei der Reifung der T-Zellen im Thymus. Gemeinsam ist den verschiedenen Molekülen eine weitgehende Homologie der Aminosäuren 70-74 im

Bereich der dritten hypervariablen Region auf der ersten Domäne der β -Kette des HLA-Komplexes, auch als „Shared Epitope“ (SE) bezeichnet (Nepom et al. 1989). Der Nachweis dieser SE ist mit höherem RA-Erkrankungsrisiko und -schweregrad verbunden (Weyand et al. 1992). Andererseits kommen die Oberflächenantigene auch bei Menschen vor, die nie an einer RA erkranken.

Eine anderes Gen, das für RA von Bedeutung sein kann, ist das Gen für PTPN22 (Protein Tyrosin Phosphatase Non-Receptor Type 22). Es codiert eine intrazelluläre Phosphatase, die an der Signaltransduktion im T-Lymphozyten beteiligt ist. Der Austausch einer Aminosäure in Position 620 [Tryptophan (W) an Stelle von Arginin] führt zu einem veränderten Protein, dessen Funktion allerdings noch nicht völlig klar ist. Die Variante PTPN22 620W wurde vermehrt bei RA-Kranken gefunden, zumindest in Nordeuropa. (Melchers und Ahnert 2008, Begovich et al. 2004)

Auch hier zeigt sich, dass die Genetik allein nicht Ursache der Erkrankung ist. Zur erbten Disposition müssen andere Faktoren hinzukommen, die noch weitgehend unverstanden sind.

Als Umwelteinfluss wird dem Rauchen von Zigaretten eine wichtige Rolle zuteil. Frauen, die über mehrere Jahre stark rauchen, haben ein erhöhtes Risiko, an RA zu erkranken. Dabei ist vor allem die Dauer des Zigarettenkonsums entscheidend, weniger die täglich zugeführte Menge (Zink und Gromnica-Ihle 2006). Wie das Rauchen in die Pathogenese eingebunden ist, konnte die Arbeitsgruppe um Klareskog zeigen. Sie fanden heraus, dass Rauchen zur Citrullinierung von Proteinen führt. Sie konnten demonstrieren, dass es eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Dauer des Rauchens und der Wahrscheinlichkeit gibt, CCP-Antikörper-positiv zu sein (Klareskog et al. 2006b)

2.1.4.2 Immunprozesse / T- und B-Zellen

Im Zentrum der antigenspezifischen Krankheitsprozesse stehen CD4-positive T-Lymphozyten. Antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten) nehmen ein bestimmtes Antigen auf, prozessieren es und präsentieren es auf ihrer Oberfläche, gebunden an RA-assoziierte HLA-DR-Moleküle, den spezifischen T-Lymphozyten.

Das Antigen, das diesen Prozess initiiert, ist bisher noch nicht bekannt. Es existiert die Möglichkeit, dass im Gelenk Autoantigene vorkommen, gegen die das Immunsystem intolerant ist, die jedoch unter normalen Umständen zu keiner Autoimmunreaktion

führen, da der Knorpel keine vaskuläre und lymphatische Versorgung besitzt. Kommt es unter bestimmten Umständen (z.B. Infekte oder Verletzungen) dazu, dass diese abgeschlossenen Autoantigene freigesetzt werden, kann eine Immunreaktion resultieren. Eine andere Möglichkeit ist ein molekulares Mimikry. Dabei bekämpft das Immunsystem einen Erreger, der Strukturähnlichkeit mit Gelenkknorpelbestandteilen hat, was gleichzeitig zu einer abnormalen Reaktion gegen körpereigene Substanzen führt (Wilson et al. 2000). Bislang konnte zwar auch hier noch kein Antigen identifiziert werden, es stehen jedoch bestimmte verbreitete Erreger wie EBV, Mykoplasmen, CMV, Parvoviren und *Proteus mirabilis* im Verdacht (Alvarez-Lafuente et al. 2005).

Das Konzept des molekularen Mimikry kann auch eine Rolle bei der Bedeutung des „Shared Epitope“ spielen. Die Aminosäuresequenz hat Ähnlichkeit zu dem Glykoprotein 110 des Epstein-Barr-Virus und zu einem Hitzeschockprotein von *Escherichia coli* (Auger et al. 1996, Roudier et al. 1988).

Auch die Generierung von Neoantigenen, die für T-Zellen fremd sind, kann pathogenetisch bedeutsam sein. Diese Antigene können z.B. durch Konformationsänderungen eines körpereigenen Proteins wie Kollagen Typ II entstehen. Eine Möglichkeit dafür ist die Bildung von Advanced Glycation Endproducts (AGEs) (Hein et al. 2005).

Folge der Antigenpräsentation ist die klonale Expansion der T-Helferzellen (Th) und ihre Aktivierung, sowie die Th1-Differenzierung und Bildung einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine.

Die Zytokine aktivieren Makrophagen, welche ebenfalls Zytokine, Chemokine und RANK-Liganden produzieren und unter anderem auf Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoblasten wirken. Außerdem kommt es zur B-Zell-Proliferation und Antikörperbildung.

Nimmt man die beschriebenen Mechanismen als ursächlich an, dann wäre im Knorpel eine klonale Vermehrung einer T-Zellpopulation oder ein eingeschränktes T-Zell-Rezeptor-Repertoire nachweisbar. Dieses konnte aber bisher nicht eindeutig belegt werden (Hein et al. 1999, Firestein und Zvaifler 1990). Auch die Anti-T-Zell-Therapie brachte in placebokontrollierten Studien nur geringe Erfolge. Allerdings könnte dafür auch die unspezifische Hemmung sowohl der Th1-Zellen als auch der Th2-Zellen verantwortlich sein (Feldmann et al. 1996).

Seit einigen Jahren weiß man, dass die jahrelang übliche Unterteilung der T-Helferzellen in Th1 und Th2 ein vereinfachtes Schema darstellt. Es gibt noch andere T-

Zellen, die bei Autoimmunprozessen Bedeutung haben können (Steinman 2007). So findet man in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten erhöhte Spiegel von IL-17. Die Arbeitsgruppe um Kamradt konnte zeigen, dass sich die Zellen, die dieses Interleukin produzieren, nicht in das übliche Th1/Th2-Schema einordnen lassen. Sie stellen eine eigene Zellpopulation dar, die Th17-Zellen. (Kamradt 2007, Weaver et al. 2007)

Einen anderen Forschungsschwerpunkt bilden regulatorische T-Zellen (Treg) (Frey et al. 2005). Es konnte nachgewiesen werden, dass CD4⁺CD25⁺ Treg bei RA eine Fehlfunktion ausüben (Boissier et al. 2009). Sie sind negative Regulatoren des Immunsystems und schütten z. B. immunsuppressive Zytokine wie IL-10 und TGF- β aus. Auch Treg stellen eine heterogene Gruppe dar. So gibt es „natürliche“ regulatorische T-Zellen (nTreg), die im Thymus entstehen, und induzierte (iTreg), die erst in der Peripherie nach Antigenkontakt differenzieren (Rutz und Scheffold 2008). Die Funktion der T-Zellen ist wahrscheinlich viel komplexer als bisher angenommen. Es gibt Hinweise, dass die proinflammatorischen Th1-Zellen selbst wichtige immunmodulatorische Funktionen ausüben und Th1-vermittelte Immunreaktionen aktiv unterdrücken können (Rutz und Scheffold 2008).

Einige Autoren vermuten als ersten Schritt in der Entstehung der RA die Aktivierung des angeborenen Immunsystems (Firestein 2003). Die Effektorzellen wie Makrophagen und dendritische Zellen erkennen Pathogene an wenigen hochkonservierten Strukturen. Diese Formationen werden als PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) bezeichnet und sind bakterielle Lipopolysaccharide, Proteoglykane, Mannane und bakterielle DNA. Toll-like-Rezeptoren sind in der Lage, PAMPs zu erkennen. Rezeptorbindung führt über Signalkaskaden zur Aktivierung spezieller Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Proteasen sowie von Adhäsionsmolekülen. All diese Stoffe könnten den stetigen Anstieg der Entzündungszellen im Gelenk bedingen.

Die Makrophagen nehmen eine Schlüsselrolle bei der Unterhaltung der Inflammation und der Gelenkzerstörung ein. Nach Aktivierung setzen sie proinflammatorische Zytokine wie IL-1, TNF- α , aber auch IL-8 und GM-CSF frei. Sie sind aber nicht nur in entzündliche Prozesse involviert, sondern über die Induktion der Osteoklastogenese auch am Knochenremodeling beteiligt (Knedla et al. 2007).

Die B-Zellreihe ist eine weitere Zellpopulation mit entscheidender Bedeutung. Anders als die T-Zellen sind sie nicht auf eine Antigenpräsentation angewiesen, sondern besitzen selbst die Fähigkeit zur Antigenprozessierung und -präsentation. So tragen sie zur T-Zellunterstützung und Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-1 bei. Außerdem sind sie für die Schaffung eines immunologischen Gedächtnisses verantwortlich und stellen die Vorläuferzellen für Plasmazellen dar, die antigenspezifische Antikörper (AK) bilden.

Das Interesse für die B-Zellen ist vor allem durch die Tatsache begründet, dass bei der RA eine vermehrte Produktion von AK gegen verschiedene Determinanten des Fc-Teils am IgG-Molekül – so genannte Rheumafaktoren (RF) – auftritt. Diese gehören überwiegend der IgM-Klasse an und sind bei etwa 75 % der Patienten nachweisbar. Ein Trend zu höherer RF-Aktivität wurde mit zunehmenden Lebensalter und für höheres Manifestationsalter beschrieben (Hein et al. 1993). RF sind an sich vermutlich nicht in der Lage, eine Arthritis auszulösen, aber ihre Komplexbildung mit IgG kann zur Komplementaktivierung führen, was sich durch chemotaktische Wirkung auf Makrophagen und Lymphozyten und damit proinflammatorischen Effekten bemerkbar macht (Silverman und Carson 2003). RF treten allerdings nicht nur bei RA auf, sondern z. B. auch beim Sjögren-Syndrom.

Relativ spezifische Antikörper für die RA sind Autoantikörper gegen posttranslational citrullinierte Peptide und Proteine (Anti-CCP-AK) (Hill et al. 2003). Diese Antikörper sind oft schon lange vor den ersten klinischen Zeichen nachweisbar. Klareskog hat ein Drei-Stadien-Modell für die Entwicklung einer Anti-CCP-AK-positiven RA entwickelt. Im ersten Stadium, der Immunantwort, lösen Umweltfaktoren wie das Rauchen die Citrullinierung von Proteinen in der Lunge aus. Veränderte Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation dieser citrullinierten Proteine kann bei genetisch prädisponierten Menschen (z. B. HLA-DR SE positiven) zur Bildung von Anti-CCP-AK führen. Die zweite Phase, die pathologische Entzündungsantwort, ausgelöst durch veränderte Proteine des Gelenkes und Rekrutierung von zirkulierenden Anti-CCP-AK, entwickelt sich später. Durch Bildung von Immunkomplexen entsteht eine unspezifische Arthritis, die später in eine chronische RA übergeht, das dritte Stadium. Es ist gekennzeichnet durch Einwanderung von Entzündungszellen, Produktion von Zytokinen und Autoantikörpern, ausgelöst durch die Immunkomplexbildung. (Klareskog et al. 2008)

Auch andere Autoantikörper, z. B. gegen Typ II-Kollagen, Hitzeschockproteine und Glucose-6-Phosphoisomerase, konnten nachgewiesen werden, sind aber nicht spezifisch für RA (Firestein 2003).

2.1.4.3 Fibroblasten

Neben den Entzündungs- und Immunzellen spielen die Fibroblasten eine wichtige Rolle. Eines der wichtigsten Ergebnisse des persistierenden Entzündungsvorgangs ist die Bildung eines erosiven Granulationsgewebes (Pannus = Tuch, Lappen) und neuer Blutgefäße. Ausgangspunkt ist die bei RA charakteristische Verbreiterung der synovialen Deckzellschicht (lining layer). Deren hauptsächliche Zellanteile machen spezielle Fibroblasten (RA-synoviale Fibroblasten), Makrophagen, lymphozytär-rundzellige Infiltrate sowie andere immunologisch relevante Zellen aus.

Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die RA-synovialen Fibroblasten (RA-SF) von normalen Fibroblasten unterscheiden und Zeichen einer stabilen und T-Zell-unabhängigen Aktivierung aufweisen (Meinecke und Pap 2006). Dies zeigt auch das Tiermodell mit Mäusen, die einen schweren kombinierten Immundefekt (SCID-Mäuse) haben. Implantiert man ihnen RA-SF gemeinsam mit normalem menschlichen Knorpel, dann kommt es zur progressiven Zerstörung des Knorpels, auch in Abwesenheit von Entzündungszellen (Muller-Ladner et al. 1996). Es konnte sogar gezeigt werden, dass die RA-SF ihre krankheitsspezifischen Eigenschaften beibehalten, wenn sie aus dem pathologisch veränderten Gewebe herausgelöst werden. So bleibt das charakteristische Reaktionsmuster auf extrazelluläre Signale (z. B. auf $\text{TNF-}\alpha$), die Fähigkeit der festen Anhaftung an die extrazelluläre Matrix des Knorpels, die Resistenz gegen den programmierten Zelltod, sowie die erhöhte Produktion matrixzerstörender Enzyme (besonders von Kathepsinen und MMP) bestehen (Pap et al. 2000). Die molekularen und zellbiologischen Grundlagen für diese Prozesse sind noch nicht voll verstanden. Die Zytokine, vor allem $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6 und IL-17, stellen einen wichtigen Stimulus für die Fibroblasten dar. Auch Adhäsionsmoleküle wie Integrine sind für die Aktivierung der RA-SF von Bedeutung. Sie vermitteln den Kontakt der Fibroblasten mit der extrazellulären Matrix des Knorpels (Korb et al. 2007).

Für die geringe Empfindlichkeit gegen den programmierten Zelltod gibt es verschiedene Erklärungsansätze (Pap 2007, Baier et al. 2003). In der Synovialflüssigkeit wurden erhöhte Spiegel an löslichen Fas gefunden, die in der Lage sind, sich an den Fas-Liganden (FasL) zu binden, ihn zu blockieren und damit die durch FasL-induzierte

Apoptose zu verhindern. Andere Untersuchungen zeigen einen erhöhten Spiegel des Signalmoleküls FLIP („FLICE inhibitory proteins“). FLIP ist ein direkter Hemmer der Caspase-8 und unterbricht die Signalkaskade, die zur Apoptose führt. Von Bedeutung ist auch das kleine Ubiquitin-artige Molekül SUMO-1 („small ubiquitin-like modifier“) (Meinecke et al. 2007). Es führt zur posttranslationalen Umstrukturierung von Proteinen, zu modifiziertem Bindeverhalten und veränderten Signalwegen.

Auch Transkriptionsfaktoren können für die anhaltende Aktivierung der RA-SF verantwortlich sein. Es wurden somatische Mutationen des p53-Gens nachgewiesen, die zur Hemmung des Tumor Suppressor p53 führen, der das Wachstum und Überleben der Zellen reguliert (Firestein et al. 1997). Außerdem ist NF- κ B, ein dimeres, DNA-bindendes Protein, in der Synovialmembran von RA-Patienten stark aktiviert (Baier et al. 2003) und trägt zur Apoptoseresistenz der RA-Fibroblasten bei. NF- κ B ist in zahlreiche Signalkaskaden involviert und reguliert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, von Adhäsionsmolekülen und matrixzerstörenden Enzymen.

Die Produktion von matrixzerstörenden Enzymen ist bedeutend für die Zerstörung des Gelenkknorpels und des Knochens. An dem Prozess sind neben Kathepsinen und dem Plasminsystem vor allem Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) beteiligt. Zu der MMP-Familie gehören mehrere Mitglieder, die sich in Aufbau und Substratspezifität unterscheiden. Kollagenase I (MMP-1) degradiert die Kollagene Typ I, II, III, VII und X nur, wenn sie als Tripelhelix vorliegen, während Gelatinase A (MMP-2) auch denaturiertes Kollagen angreift. Stromelysin (MMP-3) ist an der Aktivierung von MMPs beteiligt und kann Proteoglykane verdauen. (Meinecke und Pap 2006)

An der Matrixzerstörung bei RA sind die Kollagenasen (bes. MMP-1 und MMP-13), Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9), sowie Stromelysin (MMP-3) beteiligt (Burrage et al. 2006, Walakovits et al. 1992). Aktiviert werden sie über proinflammatorische Zytokine.

Es wirken also zahlreiche Mechanismen an der Entstehung der charakteristischen, persistierenden hyperplastischen Synovialitis mit. Ausgehend von der Synovialmembran-Knorpel-Knochen-Grenze entwickelt sich ein invasives Wachstum mit Destruktion des angrenzenden Knochen-Knorpel-Gewebes. Mit fortschreitender Krankheitsdauer kommt es dadurch zu Funktionseinbußen und Deformitäten in den betroffenen Gelenken.

Da ein solcher chronischer Entzündungsprozess mit Gewebeproliferation höhere nutritive Forderungen stellt, wird die Pannusbildung von Neovaskularisation und Angiogenese begleitet. Aktivierte Makrophagen stellen die dafür essentiellen angiogenetisch wirksamen Faktoren bereit (Koch 1998). Zu den wichtigsten zählen VEGF, FGF, EGF, Insulin-like growth factor und TGF- β . Auf diese Weise aktivierte Endothelzellen proliferieren in den Blutgefäßen. Sie exprimieren ihrerseits Plasminogenaktivatoren und Matrix-Metalloproteinasen, welche die Invasion des Bindegewebes durch proinflammatorische Zellen erleichtern und zur Ernährung des expandierten Gewebes beitragen (Bodolay et al. 2002).

2.1.4.4 Zytokine

Allen bisher geschilderten Maßnahmen ist gemeinsam, dass Zytokine als Signalvermittler in den Ablauf einbezogen sind. Sie und ihre Rezeptoren spielen eine fundamentale Rolle in der Entwicklung und Ausprägung des Entzündungsprozesses bei RA (Franke et al. 1997). Vor allem die Makrophagen- und Fibroblasten-Zytokine, wie z. B. IL-1, IL-6, IL-15, IL-18, TNF- α und GM-CSF, und verschiedene Chemokine werden in der Synovialflüssigkeit in erhöhter Konzentration nachgewiesen. Entzündungshemmende Zytokine wie IL-1RA und IL-4 werden zwar ebenfalls produziert, allerdings nicht in der Menge, die nötig wäre, um die Synovitis zu blockieren. Man geht davon aus, dass das Gleichgewicht der Zytokine gestört ist (Firestein 2003). Die erfolgreiche Therapie mit anti-TNF- α -Antikörpern bekräftigt die Wertigkeit dieser Botenstoffe für die RA. Sie vermitteln Chemotaxis von entzündlichen Zellen und regulieren Zellaktivierung und Sekretionsverhalten. Dabei wirken sie sowohl parakrin als auch autokrin. Durch Bindung an spezifische Oberflächenrezeptoren werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt.

2.1.4.5 Osteoklasten

Osteoklasten sind die einzigen Zellen, die darauf spezialisiert sind, Knochen abzubauen. Sie leiten sich von Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems ab. Für die Zellbiologie der Osteoklasten sind die Zytokine RANKL (Receptor activator of NF- κ B ligand), RANK (Receptor activator of NF- κ B) und OPG (Osteoprotegerin) wesentlich. Das RANK/RANKL/OPG-System ist wesentlich an der Regulation des Knochen-Knorpel-Metabolismus beteiligt. Gerät es aus der Balance können Gelenkschäden und systemische Osteoporose resultieren (Hein et al. 2008).

Der Ligand RANKL (auch ODF, TRANCE oder OPGL genannt) ist Mitglied der TNF-Ligandenfamilie, wird von mesenchymalen Stammzellen gebildet und existiert überwiegend membrangebunden. Es gibt einen Teil, der löslich vorliegt, den sRANKL. Dieser wird entweder primär sezerniert oder durch eine Protease vom zellgebundenen RANKL abgespalten (Hofbauer und Heufelder 2001). Eine Vielzahl von Zelltypen können RANKL exprimieren einschließlich Knochenmarkstromazellen, Osteoblasten, Osteoklasten, synoviale Fibroblasten, Chondrozyten und Endothelialzellen (Lacey et al. 1998, Wong et al. 1997, Anderson et al. 1997, Romas et al. 2000). Die primär-lösliche Form wird nur von T-Zellen (Kong et al. 1999b) und einer squamösen Karzinomzelllinie produziert (Nagai et al. 2000). Unter der Anwesenheit von M-CSF stimuliert RANKL in vitro die Differenzierung, Proliferation, Fusion und Aktivierung von Osteoklastenvorläufern und hemmt die Osteoklastenapoptose, was sich in der erhöhten Anzahl funktionell aktiver Osteoklasten und der erhöhten Knochenresorption widerspiegelt.

RANK (Synonym: ODAR) ist ein transmembranöser Rezeptor der TNF-Rezeptorfamilie und befindet sich auf der Oberfläche von Osteoklasten-Vorläuferzellen, Osteoklasten, dendritischen Zellen, B- und T-Zellen und Chondrozyten. Bindet RANKL an RANK löst das Signalkaskaden aus, die sehr komplex und noch nicht voll verstanden sind. Verschiedene TNFR-assoziierte Faktoren wie NF- κ B, c-Fos, c-Src, c-Jun N-terminale Kinase und die Serin/Threonin Kinase PKB/Akt sind darin einbezogen (Hofbauer und Heufelder 2001).

Rezeptorantagonist OPG (Synonyme: OCIF) ist ein lösliches Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie und wird ubiquitär von vielen Zellen und Geweben gebildet (Hofbauer und Heufelder 2001). Er fungiert als Fängerrezeptor für lösliches und auch membrangebundenes RANKL und kann dadurch die Interaktion RANK – RANKL verhindern. OPG vermittelt also genau gegenteilige Effekte von RANKL.

In zahlreichen tierexperimentellen Studien konnten die Wirkungen dieser Zytokine erforscht werden. Mäusen, denen man RANKL injiziert, entwickeln erhöhte Osteoklastenformation und -aktivität, eine schwere Osteoporose und versterben an schwerer Hyperkalzämie. Bei RANKL-Knock-out Mäusen kommt es zu schwerer Osteopetrose aber auch zu Immundefekten, Lymphknoten-Agenesie, Thymus-Hypoplasie sowie Störungen der Entwicklung von dendritischen Zellen, T- und B-Zellen (Kong et al. 1999a).

Transgene Mäuse, die OPG überexprimieren, entwickeln eine Osteopetrose ohne Immundefekte (Simonet et al. 1997). Der gleiche Effekt ist auch durch die parenterale Injektion von OPG induzierbar. OPG-Knock-out-Mäuse haben eine schwere Osteoporose und können arterielle Kalzifizierungen aufweisen (Bucay et al. 1998).

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass durch Krafteinwirkung die Bildung von OPG induziert wird. Biomechanische Impulse führen zu einer Steigerung des knochenprotektiven OPGs. Gleichzeitig wird durch mechanische Belastung die Expression von RANKL deutlich gehemmt. Dieser Mechanismus kann bei der schmerzbedingten Schonung von Gelenken wichtig sein.

Es gibt zahlreiche Zytokine, Peptide, Wachstumsfaktoren, Steroidhormone und Medikamente, die dieses System beeinflussen (Hofbauer und Heufelder 2001). Zytokine, die den RANKL-mRNA-Spiegel erhöhen, sind z.B. IL-1, IL-11, IL-17, Prostaglandin E₂, und TNF- α .

IL-1 und TNF- α haben außerdem die Fähigkeit die Osteoklasten durch Mechanismen zu beeinflussen, die unabhängig vom RANK/RANKL/OPG-System sind, auch IL-6 und IL-11 scheinen diese Fähigkeit zu besitzen (Kudo et al. 2003).

Therapeutisch können Vitamin D und K, verschiedene Östrogene, Bisphosphonate und die schon erwähnte mechanische Belastung die Konzentration von OPG steigern.

Franke et al. konnte zeigen, dass auch den Advanced Glycation Endproducts eine funktionelle Rolle bei der Entwicklung von Knochenkrankheiten zuteil wird. Sie wiesen nach, dass Akkumulation von AGEs im Knochen eine Zunahme der mRNA-Expression von RAGE und RANKL, sowie einen Rückgang der mRNA von alkalischer Phosphatase und Osteocalcin bedingen. Durch AGEs werden somit wahrscheinlich die Osteoblasten durch Aktivierung des AGE – RAGE – Signalweges verändert, die Osteoklastenbildung induziert und die Matrixmineralisation herabgesetzt. (Franke et al. 2007)

RANKL und OPG sind auch bei der RA wichtige Regulatoren. In-vitro-Studien konnten zeigen, dass aktivierte T-Zellen lösliches und zellgebundenes RANKL bilden und funktionell aktive Osteoklasten induzieren (Kong et al. 1999b). Dieser Mechanismus könnte die Verbindung von Immunsystem und Knochenmetabolismus sein. Auch tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass systemische Aktivierung von T-Zellen zu schweren Knochen- und Gelenkerstörungen führt. Diese Skelettmanifestationen konnten durch die Gabe von OPG verhindert werden, was selektiv den Knochenschaden behob, aber nicht die Immunantwort beeinflusste. Es kann demnach sinnvoll sein, eine

kombinierte Therapie einzusetzen, die durch Blockade von IL-1 oder TNF- α die Entzündung hemmt und durch OPG-Substitution die Knochendestruktion verhindert.

Bei RA-Patienten wurde gezeigt, dass T-Zellen und synoviale Fibroblasten des Synovialgewebes hohe Mengen an RANKL produzieren (Gravallese et al. 2000, Takayanagi et al. 2000). Hein et al. vermuten, dass bei RA ein größerer Anteil von sRANKL an OPG gebunden vorliegt, dass allerdings die Kapazität von OPG nicht ausreicht, um sRANKL zu neutralisieren und damit die Osteoklastenaktivität und den Knochenschaden im Gelenk zu verhindern (Hein et al. 2008).

Die Blockade von RANKL erwies sich in verschiedenen tierexperimentellen Studien eindeutig als ein effektives Therapieprinzip. Dieser Ansatz könnte in Zukunft auch zur Verhinderung der Knochendestruktion bei Patienten mit RA sinnvoll sein.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es viele verschiedene Erklärungsmodelle für die Entstehung der RA gibt. Es wird auch immer mehr versucht, die verschiedenen Ansätze in einem möglichen Gesamtkonzept zu vereinigen. Durch neue Forschungsergebnisse und die Vielfältigkeit der Ansätze ist dies bisher nur unzureichend gelungen.

Möglicherweise handelt es sich um eine Kombination aus zufälligen Ereignissen (z. B. Aktivierung des natürlichen Immunsystems), prädisponierenden Eigenschaften (genetischer Hintergrund) und der Reaktion des adaptiven Immunsystems gegen Autoantigene.

Man könnte aber auch vermuten, dass sich hinter dem Krankheitsbild RA vielleicht viele verschiedene Krankheiten mit dem gleichen klinischen Erscheinungsbild aber unterschiedlicher Pathogenese verbergen.

Es bedarf sicher noch einiger interdisziplinärer Forschung, um diese Fragen vollständig zu klären.

2.1.5 Klinische Kennzeichen

Zu Beginn der Erkrankung treten häufig Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, Fieber, nächtliches Schwitzen und Depressionen auf, die häufig noch nicht an eine RA denken lassen. Die „klassische“ RA zeichnet sich durch Schmerzen und Bewegungseinschränkung der kleinen Gelenke, bevorzugt Metacarpophalangealgelenke (MCP) und proximale Interphalangealgelenke (PIP) der Finger, aus; auch Metatarsophalangealgelenke (MTP) und Handgelenke sind zeitig involviert. In den Krankheitsprozess können theoretisch alle Gelenke einbezogen werden, lediglich die

distalen Interphalangealgelenke, das Sakroiliakgelenk und die lumbale Wirbelsäule werden oft verschont (Grassi et al. 1998).

Ein Frühsymptom kann die Morgensteifigkeit sein. Sie wird als langsame oder schwierige Bewegbarkeit der Gelenke nach dem morgendlichen Aufstehen oder dem Verharren in einer Position beschrieben. Sie betrifft beide Körperhälften und verbessert sich mit zunehmender Bewegung (Lineker et al. 1999). Dieses Symptom kommt so gut wie bei allen entzündlichen Arthropathien vor. Eine Steifigkeit, die eine Stunde andauert, ist jedoch typisch für die RA. Ebenso charakteristisch sind die Druckempfindlichkeit und die tastbare Gelenkschwellung der MCP- und MTP-Gelenke. Das Gaenslen-Zeichen ist positiv. Im Entzündungsschub können Ergüsse auftreten.

Im Krankheitsverlauf kommt es häufig zu Fehlstellungen wie der Schwanenhals- und Knopflochdeformität sowie zur ulnaren Deviation der Finger. Gefürchtet sind auch Subluxationen und Instabilitäten der zervikalen Wirbelkörper, die zu Kompressionen des Rückenmarks führen können.

Neben dem Gelenkbefall können auch extraartikuläre Manifestationen auftreten. Wie vielfältig sie sein können zeigt Tabelle 1.

Bei etwa 20 % der Fälle entstehen Rheumaknoten. Dabei handelt es sich um frei im subkutanen Gewebe liegende Granulome, die histologisch aus einer zentralen fibrinoiden Nekrose bestehen, um die sich palisadenförmig Fibroblasten, Epitheloidzellen und mononukleäre Zellen angeordnet haben. Die Knoten treten häufig an den Streckseiten auf oder an Stellen, die erhöhtem Druck ausgesetzt sind.

An den Augen können Keratoconjunctivitis sicca, Skleritis oder Episkleritis auftreten.

Die Lungenbeteiligung ist relativ häufig, kann klinisch aber unbemerkt bleiben. Die Pleuritis wird oft erst in der Autopsie erkannt. Lungenfibrose, Lungenknötchen und Bronchiolitis sind andere Erkrankungsmöglichkeiten.

Bei vielen Erkrankten wird auch der Knochenstoffwechsel einbezogen, es entwickelt sich sowohl eine gelenknahe als auch eine systemische Osteoporose. Die Ursachen des Knochenmasseverlustes sind vielfältig, wie z. B. krankheitsbedingte Immobilisation, Therapie mit Glukokortikoiden, erhöhtes Alter und postmenopausales Östrogendefizit. (Hein 2001)

Bei Rheumatikern ist das kardiovaskuläre Risiko erhöht. Sie erleiden häufiger einen stillen Myokardinfarkt oder plötzlichen Herztod (Maradit-Kremers et al. 2005).

Tabelle 1: Extraartikuläre Manifestationen der RA

Organ	Erkrankung
Allgemeinsymptome	Abgeschlagenheit, Schwitzen, Fieber, Gewichtsverlust
Haut	Rheumaknoten, Palmarerythem, Ulkus
Lunge	Pleuritis, Fibrose, Rheumaknoten, Bronchiolitis
Herz	Perikarditis, granulomatöse Myokarditis, Herzklappenveränderungen
Niere	Glomerulopathie, Amyloidose
Leber	Leberenzymerrhöhung
Hämatologie	Anämie, Thrombozytose, Leukozytose
Auge	Keratoconjunctivitis sicca, Skleritis, Episkleritis
Gefäße	Vaskulitis, Arteriosklerose

Die Herzbeteiligung im Sinne eines extraartikulären Organbefalls stellt eher die Ausnahme dar, echokardiografisch und autoptisch konnten zwar bei 15-50 % der RA-Patienten eine Perikarditis nachgewiesen werden, häufig war diese jedoch symptomlos. Für das gesteigerte Risiko scheinen erhöhte Konzentrationen von Akut-Phase-Proteinen und Zytokinen (TNF- α , IL-6), sowie die endotheliale Dysfunktion verantwortlich zu sein. Also ist die RA selbst ein Risikofaktor für ischämische Herzkrankheit (Seidel et al. 2006). In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Dauer der RA mit dem Auftreten einer Arteriosklerose verbunden ist (Del Rincon et al. 2007).

Dieses Wissen sollte in die therapeutischen Überlegungen mit einbezogen werden. Der unkritische Einsatz von NSAR und zu hoch dosierten Steroiden kann sich negativ auf kardiovaskuläre Ereignisse auswirken.

Auch die Prognose wird durch die therapiebedingten Komplikationen mit bestimmt. So können lebensgefährliche gastrointestinale Blutungen durch NSAR auftreten und schwere Infektionen unter den DMARDs. Die Lebenserwartung ist im Durchschnitt um 7 Jahre vermindert.

Die Variation der klinischen Ausprägung kann bei dem individuellen Patienten sehr groß sein, es ist wichtig, die verschiedenen Manifestationen zu berücksichtigen.

2.1.6 Diagnose

Die Diagnose der rheumatoiden Arthritis wird aufgrund typischer Symptome und klinischer Zeichen, ergänzt durch radiologische Veränderungen und Laborbefunde, gestellt.

Ein voll ausgeprägtes Stadium der RA zu diagnostizieren, stellt kein Problem dar. Schwierig ist die Frühdiagnostik, da pathognomonische Befunde und charakteristische Frühsymptome fehlen. Es vergeht im Schnitt etwa ein Jahr, bis der Patient einer gezielten rheumatologischen Diagnostik zugeführt wird. Ein frühes Erkennen ist für die Langzeitprognose entscheidend, denn nur dann ist die Chance auf komplette Remission gegeben. So kann die Progression und Gelenkdestruktion minimiert werden.

Als ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel dienen die Kriterien des American College of Rheumatology (ACR-Kriterien) (Arnett et al. 1988). Eine sichere RA liegt vor, wenn vier der sieben Kriterien, die in Tabelle 2 aufgezählt werden, erfüllt sind.

Die Punkte wurden aber primär als Klassifikationskriterien entwickelt, also um Datenvergleichbarkeit und Studiendurchführung zu erleichtern, und nicht als Diagnosekriterien für den klinischen Alltag. Bei dem individuellen Patienten kann es Monate bis Jahre dauern, bis die ACR-Kriterien erfüllt sind, wenn die Erkrankung sich also schon deutlich manifestiert hat. Zur Frühdiagnose im engeren Sinne dienen sie demnach nicht. (Bernhard et al. 2001)

Anamnese und klinische Untersuchung sind die wichtigsten diagnostischen Maßnahmen (Fath 2007). Symmetrische Beschwerden der kleinen Gelenke, vor allem der MCP- und PIP-Gelenke, sind typisch. Auch Schmerzen, Schwäche, morgendliche Steifigkeit, die mindestens 15 Minuten andauert, Gelenkschwellung und gegebenenfalls bräunliche Verfärbung über den Gelenken können auftreten. Einige Patienten stellen sich auch initial mit einem Karpaltunnelsyndrom vor oder klagen über extraartikuläre Symptome. Laboruntersuchungen sind für die Beurteilung der Erkrankung auch wichtig. Die BSG und das CRP sind nicht spezifisch für die RA. Sie können jedoch wichtige Hinweise auf ein entzündliches Geschehen geben, zur Aktivitätsdiagnostik herangezogen werden und nichtinflammatorische Differentialdiagnosen wie die Fibromyalgie ausschließen.

Auch Autoantikörper können zur Erkennung einer RA hilfreich sein (Nell et al. 2005). So zum Beispiel der Rheumafaktor (RF), der bei 70-80 % der RA-Patienten vorkommt. Die diagnostische Aussagekraft ist allerdings limitiert, da auch Patienten mit anderen Erkrankungen wie z.B. Kollagenosen, Sjögren-Syndrom aber auch Gesunde diese

Tabelle 2: Klassifikationskriterien für die rheumatoide Arthritis (gemäß American Collage of Rheumatology 1987)

<ol style="list-style-type: none"> 1. Morgensteifigkeit von mindestens 1 Stunde Dauer 2. Weichteilschwellung/Arthritis in mindestens drei Gelenkregionen (PIP-; MCP-, Handgelenk, Ellenbogen, Knie, Sprunggelenk, MTP-Gelenk) 3. Weichteilschwellung/Arthritis im Handgelenk, MCP- oder PIP-Gelenk 4. Symmetrischer Befall 5. Rheumaknoten 6. Rheumafaktor positiv 7. Typische radiologische Veränderungen der Hand mit Erosionen
<p>Eine RA liegt dann vor, wenn wenigstens 4 Kriterien erfüllt sind.</p> <p>Die Kriterien 1-4 müssen seit 6 Wochen bestanden haben.</p>

Autoantikörper bilden. Andererseits sind sie bei ca. 20 % der Krankheitsfälle nicht nachweisbar (seronegative RA). Seit einigen Jahren stehen für die Diagnostik noch weitere Tests zur Verfügung (z. B. Anti-Keratin und Anti-Filaggrin). Diese beruhen alle auf dem Nachweis von AK gegen Proteine mit der Aminosäure Citrullin, die durch Modifikation aus der Aminosäure Arginin entsteht. Ein zuverlässiger Nachweis von Anti-CCP-AK wurde mit der Entwicklung des CCP-Tests erreicht. Er weist eine ähnliche Sensitivität auf wie die RF, die Spezifität liegt aber wesentlich höher (rund 96-98 % vs. 75 %) (Sauerland et al. 2005, Vogt et al. 2006). Die Antikörper sind häufig schon Jahre vor dem eigentlichen Krankheitsausbruch nachweisbar (Raptopoulou et al. 2007, Nell et al. 2005). In der Frühdiagnostik kommt der kombinierten Bestimmung der RF und den Anti-CCP-AK große Bedeutung zu. Wenn beide Tests hochpositiv ausfallen, spricht das für einen schweren Verlauf mit persistierender und destruierender Arthritis, was sich auch in einem raschen Fortschreiten der radiologischen Läsionen zeigt und mit einer schlechten Prognose einhergeht (Nell-Duxneuner et al. 2009). Andere Auffälligkeiten im Labor wie Anämie, Thrombozytose, Leukozytose, Antinukleäre Antikörper und Hypoalbuminämie sind unspezifisch.

Da Erosion von Knorpel und Knochen Hauptprobleme der RA darstellen, sind bildgebende Verfahren unerlässlich. Ähnlich anderen Merkmalen wird auch das Vorhandensein von Gelenkschäden diagnostisch verwertbarer, umso mehr die Erkrankung voranschreitet. Bei Verdacht auf RA zählt die konventionelle

Röntgendiagnostik noch immer zur Basisdiagnostik. Es sollten Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen von beiden Händen und Vorfüßen angefertigt werden (Backhaus und Scheel 2006). Arthritische Frühzeichen sind gelenknahe Osteoporose auf Höhe der MCP- und PIP-Gelenke sowie Weichteilschwellung. Radiologische Direktzeichen sind Schwund der subchondralen Granzlamelle, Erosionen und zystische Defekte sowie konzentrische Gelenkspaltverschmälerung. Die Erosionen sind weitgehend spezifisch für RA, dabei sind am häufigsten die MCP-, PIP-, MTP-Gelenke und das Caput ulnae betroffen. Im Endstadium finden sich auch Subluxationen und Ankylose. Das Problem dieses Verfahrens ist, dass es strukturelle Gelenkveränderungen häufig frühestens sechs Monate nach Krankheitsbeginn nachweisen kann. Im Rahmen der Frühdiagnostik konnte die gelenknahe Osteoporose mittels Knochendichtemessung mithilfe der DXA-Methode objektiviert werden (Backhaus und Scheel 2006, Pfeil et al. 2006, Bottcher et al. 2006).

Auch andere Untersuchungen wie Arthrosonografie und Magnetresonanztomografie (MRT) können Schäden frühzeitiger nachweisen. Die Arthrosonografie kommt vor allem bei der frühen rheumatoiden Arthritis zum Einsatz. Der gute Weichteilkontrast ermöglicht die Differenzierung von exsudativen und proliferativen Synovialisveränderungen sowie Sehnenscheidenentzündungen. Oberflächlich liegende Knochenläsionen/-erosionen können sonografisch frühzeitiger als mit konventionellem Röntgen erfasst werden. Die Sonografie kann zum Teil Entzündungszeichen erkennen, auch wenn die Gelenke klinisch noch nicht geschwollen wirken. Sie ist ein kostengünstiges, nicht invasives, beliebig oft wiederholbares Verfahren (Szkudlarek et al. 2006). In der Kombination mit der Power-Doppler-Technik eignet sich die Sonografie besonders zur Darstellung des vaskularisierten Pannusgewebes entzündlicher Gelenke und hilft bei der Beurteilung der Entzündungsaktivität (Backhaus et al. 2006).

Auch die MRT erlaubt eine frühe Darstellung und Differenzierung der Weichteilschwellung. Sie hat sich als sensitiver in der Erfassung von Synovitiden und Erosionen gezeigt und ist die einzige Methode, mit der ein Knochenmarködem dargestellt werden kann, das als Prädiktor für die Entwicklung eines erosiven Verlaufes steht. Ein Vorteil gegenüber dem Röntgen ist die fehlende Strahlenbelastung. Von Nachteil sind ein deutlich höherer Aufwand (zeitlich und finanziell), die Invasivität mit der Notwendigkeit der Kontrastmittelgabe, sowie Ausschlusskriterien (Metallimplantate oder Herzschrittmacher). Deshalb wird die Methode häufig bei speziellen

Fragestellungen (z. B. Dislokation des Dens axis) eingesetzt. Es zeigt sich aber, dass die MRT vor allem in der Frühdiagnostik von Bedeutung ist und damit auch einen zeitigen Therapiebeginn ermöglicht. Erosive Knochenläsionen lassen sich ca. ein bis zwei Jahre eher im MRT erfassen als mit konventionellem Röntgen (Backhaus und Scheel 2006). Die Nutzung im klinischen Alltag wird sicher zunehmen.

Die Skelettszintigrafie ist eine Screeningmethode bei unklarer Gelenksymptomatik und unauffälligem Röntgenstatus. Über den Einstrom von Radionukleotiden lassen sich Areale mit erhöhter knöcherner Umbauaktivität (Hot Spots) erkennen (Backhaus et al. 2002). Die Spezifität des Verfahrens ist allerdings gering, man kann nicht zwischen degenerativen, traumatischen, entzündlichen oder tumorbedingten Prozessen unterscheiden.

Aufgrund der möglichen extraartikulären Manifestationen sind häufig Zusatzuntersuchungen nötig.

Ob und in welchem Umfang systemisch oder lokal bestimmte Marker des Skelettmetabolismus zur Erweiterung der diagnostischen Möglichkeiten beitragen können, bleibt abzuwarten (Smolen et al. 2008). Im Rahmen der Frühdiagnostik verspricht man sich von solchen Parametern einen Nutzen.

Es könnten Biomarker sein wie die Kollagen-Crosslinks Pyd und DPyd oder das Matrixprotein COMP.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es keine einzelne Manifestation, keinen Labortest und keine Studie gibt, mit der man die Diagnose RA mit Sicherheit stellen kann.

2.1.7 Therapie

Es steht momentan noch kein kausales Therapieregime zur Verfügung. In den letzten Jahren wurden durch die Entwicklung neuer Medikamente enorme Fortschritte erzielt. Aletaha und Smolen formulierten drei wesentliche Ziele der RA-Therapie. An erster Stelle sollen die Reduktion der Krankheitsaktivität, der Gelenkdestruktion und die Verhinderung irreversibler Behinderung stehen. Ein weiteres Ziel ist das Erreichen eines Zustandes der Remission, um die weitere Gelenkdestruktion zu vermindern und körperliche Funktionsfähigkeit zu erhalten. Als Drittes wird der Erhalt des Remissionszustandes gefordert, da nur dadurch minimale Restdestruktionen unterbunden werden können. Wichtig ist der frühzeitige Eingriff in das

Krankheitsgeschehen, denn nur in der Frühphase kann das Auftreten einer Gelenkzerstörung vermieden werden (Aletaha und Smolen 2009).

Die Behandlung erfolgt interdisziplinär. Neben der pharmazeutischen Therapie und chirurgischen Interventionen ist es auch wichtig, den Patienten über sein Krankheitsbild durch Schulungen zu informieren. Eine rheumatologische Mitbetreuung verhindert eine Unterversorgung (Westhoff und Zink 2007).

In der medikamentösen Therapie wurde das traditionelle Konzept der Behandlungspyramide verlassen, in dem Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) als breite Basis eingesetzt wurden und erst nach Wochen oder Monaten Basistherapeutika [disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs)] zum Einsatz kamen (Ziswiler und Villiger 2001). Um die Gelenkschäden zu vermeiden, die häufig in der Initialphase entstehen, ist eine effektive krankheitsmodifizierende Therapie sofort nach Diagnosestellung entscheidend und bestimmt den weiteren Verlauf („hit hard and early“).

Eine kleine Übersicht über häufig eingesetzte Medikamente geben die Tabellen 3 bis 6. Im Rahmen der symptomatischen Therapie gehören die NSAR oder die selektiven COX-2 Hemmer zum festen Behandlungskonzept. Durch die Blockade der Cyclooxygenase hemmen sie die Prostaglandinsynthese, wirken antiinflammatorisch und analgetisch. Sie zeichnen sich durch einen schnellen Wirkungseintritt aus, ändern aber nichts am Krankheitsverlauf.

Ebenfalls zum Einsatz kommen die Glukokortikoide, die lokal oder systemisch verabreicht werden können. Sie sind vor allem in Phasen hoher Krankheitsaktivität hilfreich, als überbrückende Entzündungshemmung bis die Wirkung der Basistherapeutika zum Tragen kommt (Ziswiler und Villiger 2001). Zur Langzeitanwendung sollten sie tiefdosiert (unter 7,5 mg Prednison-Äquivalent) oral eingenommen werden.

Eine Beeinflussung des Krankheitsverlaufes gelingt häufig nur durch DMARDs. Diese werden in zwei Gruppen unterteilt: Non-Biologicals (oder konventionelle DMARDs) (siehe Tabelle 5) und Biologicals (siehe Tabelle 6). Der Wirkungseintritt der konventionellen Basistherapeutika setzt häufig mit Verzögerung ein.

Die Biologicals sind rekombinant-hergestellte Antikörper, AK-Fragmente oder Fusionsproteine, die zielgerichtet entzündlich immunologische Vorgänge blockieren können. Die Therapieform ist allerdings mit sehr hohen Kosten verbunden.

Tabellen 3 bis 6: Übersicht über Medikamente, die zur RA-Therapie eingesetzt werden

Tabelle 3 Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) – Hemmung der proinflammatorischen Prostaglandin-Synthese

unselektive Cyclooxygenase-Hemmer z. B.	selektive Cyclooxygenase-II-Inhibitoren z. B.
<ul style="list-style-type: none"> • Ibuprofen • Diclofenac • Naproxen 	<ul style="list-style-type: none"> • Celecoxib • Etoricoxib

Tabelle 4 Glukokortikoide – Wirkung durch Immunsuppression/-modulation und Hemmung der Zytokinsynthese

<ul style="list-style-type: none"> • Prednisolon • Methylprednisolon • Triamcinolon
--

Tabelle 5 Non-Biologicals (oder konventionelle DMARDs)

Wirkung vorwiegend antiproliferativ	Wirkung primär immunmodulierend/-suppressiv:
<ul style="list-style-type: none"> • Sulfasalazin • Hydroxychloroquin 	<ul style="list-style-type: none"> • Methotrexat • Leflunomid • Azathioprin • Cyclosporin A

Tabelle 6 Biologicals – selektive Interaktion mit Molekülen oder Rezeptoren, die an entzündlichen immunologischen Prozessen beteiligt sind

TNF α -Inhibitoren	Interleukin 1-Inhibitor	Anti-CD20-AK
<ul style="list-style-type: none"> • Etanercept • Infliximab • Adalimumab 	<ul style="list-style-type: none"> • Anakinra 	<ul style="list-style-type: none"> • Rituximab
	Interleukin 6-Inhibitor	CTLA4-Ig
	<ul style="list-style-type: none"> • Tocilizumab 	<ul style="list-style-type: none"> • Abatacept

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien mit verschiedenen krankheitsmodifizierenden Substanzen durchgeführt, die gute Erfolge bei der Behandlung der RA aufzeigen konnten (Smolen et al. 2006, Genovese et al. 2005, Mullan und Bresnihan 2003, Sharma et al. 2004).

Das American College of Rheumatology hat 2008 Empfehlungen zu dem Gebrauch der DMARDs veröffentlicht. Je nach Krankheitsaktivität und Dauer werden verschiedene Medikamente bzw. Kombinationen empfohlen (Saag et al. 2008). Außerdem gibt es Hinweise, welche regelmäßigen klinischen Untersuchungen und Laborkontrollen durchgeführt werden sollen, da die einzelnen Mittel zum Teil schwere Nebenwirkungen oder unerwünschte Effekte zeigen.

Die Radiosynoviorthese stellt eine weitere Behandlungsoption dar. Mittels einer Weichteilskelettszintigrafie werden entzündliche Gelenke ermittelt und danach radioaktive Substanzen (Betastrahler mit wenigen Millimetern Reichweite) an entsprechende Stellen injiziert. Auf diese Weise wird die Synovialmembran fibrotisch und sklerotisch verändert und die Entzündungsreaktion gestoppt (Kampen et al. 2007). Die behandelten Strukturen werden häufig längerfristig schmerzfrei. Das Verfahren stellt vor allem bei Befall einzelner Gelenke eine Ergänzung zur Basistherapie dar.

Indikationen zu einem operativen Eingriff stellen unerträgliche Schmerzen, drohende Sehnenruptur oder schwere funktionelle Behinderung dar. Dabei ist die Synovektomie (arthroskopisch oder chirurgisch) die häufigste Intervention in der Rheumachirurgie, aber auch Fehlstellungskorrekturen und Gelenkersatz durch Endoprothesen kommen zum Einsatz. Dabei ist es schwierig, den richtigen Zeitpunkt abzugreifen, da zu langes Warten zu Muskelatrophie führen kann, was die postoperative Rehabilitation erschwert. Auf der anderen Seite muss aber z.B. bei endoprothetischem Gelenkersatz die Lebensdauer des Implantats mit bedacht werden.

Die physikalische Therapie ist für den Erhalt der Gelenkintegrität unerlässlich. Wärme-, Kälte-, Hydro- und Elektrotherapie sind mögliche Optionen. Auch passive und aktive Bewegungsübungen, Ultraschallbehandlung und Entspannungstraining können Funktionen erhalten und Schmerzen lindern. Der Patient hat hier die Möglichkeit, aktiv in das Krankheitsgeschehen einzugreifen. Er kann jedoch nur mitarbeiten, wenn er über seine Erkrankung informiert ist. Deshalb sind auch Patientenschulungen Teil der effektiven Behandlung.

2.2 Kollagen und Abbaumarker von Knorpel und Knochen

Das Grundwissen über die Strukturen des Knorpel- und Knochengewebes hat sich in den letzten Jahren ständig vergrößert. Anhand von gewebe-spezifischen, in die Synovialflüssigkeit oder das Blut freigesetzten Knorpel- bzw. Knochenmatrix-Makromolekülen kann der Umsatz von Gewebe untersucht werden. Krankheitsprozesse, die mit einer fortschreitenden Gelenkdestruktion einhergehen, betreffen fast immer auch den Gelenkknorpel. Solche Marker könnten Entscheidungshilfen in der Frühdiagnostik oder der Kontrolle des Therapieverlaufs sein.

2.2.1 Die Extrazelluläre Matrix

Die verschiedenen Formen des Bindegewebes leiten sich vom embryonalen Bindegewebe, dem Mesenchym, ab. Bindegewebszellen im engeren Sinne sind die Fibroblasten, Abkömmlinge davon die Chondroblasten und Osteoblasten. Diese Zelltypen synthetisieren den größten Teil der extrazellulären Matrix (EZM). Die gebildeten Proteine können in vier Gruppen eingeteilt werden:

- Kollagen – strukturgebend für Haut, Sehnen, Bänder und Hartgewebe
- Elastin – vermittelt Elastizität
- Proteoglykane – bilden Polyanionen mit hoher Wasserbindungskapazität, Permeabilitätsbarriere
- Nichtkollagene Glykoproteine – nahezu unüberschaubare Gruppe von Oberflächen-assoziierten Molekülen mit Rezeptor- und Verbindungsfunktionen

Die Kollagene machen mehr als die Hälfte des gesamten Körperproteins aus. Die Vielzahl der Kollagene wird in fibrilläre, nichtfibrilläre und fibrillenassoziierte Kollagene unterteilt. Wichtige fibrilläre Kollagene und die Hauptkollagene des Bindegewebes von Knochen, Knorpel, Haut und Sehnen sind die Typ I-III Kollagene (vergleich

Tabelle 7).

Gemeinsame Kennzeichen aller Kollagene sind die Ausbildung von Tripelhelices und die über weite Strecken stereotype Aminosäure-Sequenz Glycin-X-Y, wobei X und Y häufig Prolin und Hydroxyprolin sind. An der Y-Position kann auch Hydroxylysin

auftreten. Je drei linksgängige Helices bilden gemeinsam eine rechtsgängige Superhelix aus.

Tabelle 7: Kollagenhaupttypen und ihre Lokalisation

Kollagentyp	Lokalisation
I	Knochen, Sehnen, Bänder, Haut
II	Knorpel, Glaskörper
III	dehnbare Gewebe wie Haut, Gefäße

Die Hauptunterschiede zwischen den einzelnen Kollagentypen bestehen in der Länge der tripelhelikalen Abschnitte, kurzen Unterbrechungen in der Helix und in dem zusätzlichen Vorhandensein von globulären Domänen. Dadurch erhalten die Kollagene unterschiedliche biologische Eigenschaften. (Deutzmann et al. 2003)

Die mechanische Stabilität und Zugfestigkeit wird durch verschiedene Interaktionen gewährleistet. Bei der Kollagensynthese wird bereits intrazellulär an Prolin-Resten hydroxyliert sowie glykosyliert und das Prokollagen aus drei Polypeptidketten gebildet. Die Hydroxylgruppen der Hydroxyproline ermöglichen die Wasserstoffbrückenbildung zwischen den benachbarten Ketten und stabilisieren die Struktur. Prokollagen wird in extrazellulären Kompartimenten von Fibroblasten prozessiert und zu Fibrillen aneinandergelagert. Durch wechselweise hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen, die durch die versetzte parallele Anordnung der Moleküle möglich werden, wird die Zugfestigkeit weiter erhöht.

Wesentlich für die Steigerung der Stabilität der Kollagenfibrillen ist auch die langsam ablaufende extrazelluläre Quervernetzung, das Crosslinking. Voraussetzung dafür ist die Oxidation von Lysin/Hydroxylysinresten, die durch das kupferhaltige Enzym Lysyloxidase katalysiert wird. Die einfachste Form dieser kovalenten Verbindung ist die Kondensation von Allysin mit einem Lysin zu einer Schiffschen Base. Durch anschließende Amadori-Umlagerung entsteht ein Produkt, das nicht mehr säureempfindlich ist. Es gibt aber auch noch wesentlich kompliziertere Reaktionen, an denen drei Aminosäuren unter Ausbildung von Pyridin-Derivaten beteiligt sind.

Hauptvertreter dieser Crosslinks sind Pyridinolin (Pyd) und Desoxypyridinolin (DPyd), die im nächsten Abschnitt genauer erläutert werden.

Die EZM des Erwachsenen besitzt in der Regel einen recht geringen Stoffumsatz, die Halbwertszeit variiert in der Regel zwischen 30 und 200 Tagen. Der Abbau des Kollagens wird von Serinproteasen, Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und Kathepsin K katalysiert. Die MMPs wurden in einem vorherigen Abschnitt schon genauer erläutert. Sie unterliegen einer feinen Steuerung und werden normalerweise nur lokal aktiviert. Außerdem gibt es eine Reihe von Inhibitoren der MMPs, die TIMP (Tissue Inhibitors of Metalloproteinase) genannt werden.

Normalerweise besteht ein fein reguliertes Gleichgewicht der Prozesse, auf dessen Balance eine Vielzahl von Faktoren, wie z.B. TNF- α , IL-1 β und Prostaglandin E₂ Einfluss nehmen (Rannou et al. 2006). Bei der RA ist dieses Gleichgewicht gestört (McCachren 1991).

2.2.2 Kollagen-Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin

Wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, trägt die Ausbildung von Crosslinks, deren wichtigste Vertreter Pyridinolin (Pyd) und Desoxypyridinolin (DPyd) sind, wesentlich zur Stabilität der Kollagene bei. Diese trifunktionellen Hydroxypyridinium-Quervernetzungen besitzen drei Verbindungsarme, von denen jeweils zwei an Ketten innerhalb einer Tripelhelix ansetzen und der Dritte den Kontakt zu der benachbarten Helix herstellt. Bei DPyd verbinden sich zwei Hydroxylysinreste und ein Lysinrest, bei Pyd drei Hydroxylysinreste. Pyd wurde erstmals von Fujimoto in der Achillessehne von Rindern nachgewiesen (Fujimoto 1977), Ogawa isolierte erst später DPyd (Ogawa et al. 1982).

Crosslinks kommen ausschließlich im reifen Kollagen vor und nicht in neusynthetisierten Vorläuferprodukten. Sie stellen also Endprodukte dar, die erst bei der enzymatischen Kollagendegradation wieder freigesetzt werden. Diese Eigenschaft erlaubt es, sie als sensitive Knorpel- und Knochenabbaumarker zu verwenden. Die Degradations-Produkte werden im Organismus nicht weiter reutilisiert und daher renal weitgehend unverändert eliminiert (Seibel et al. 1992).

Die Pyridiniumderivate kommen endogen in zwei verschiedenen Varianten vor. Ein Teil ist an Peptidreste gebunden mit daraus folgendem unterschiedlichen Molekulargewicht, bei Gesunden ca. 45 %. Der andere Teil liegt als freie, niedermolekulare Form

vor und beträgt ca. 55 % (Schmidt-Gayk 1996). Die Strukturformeln der freien Crosslinks sind in Abbildung 1 dargestellt.

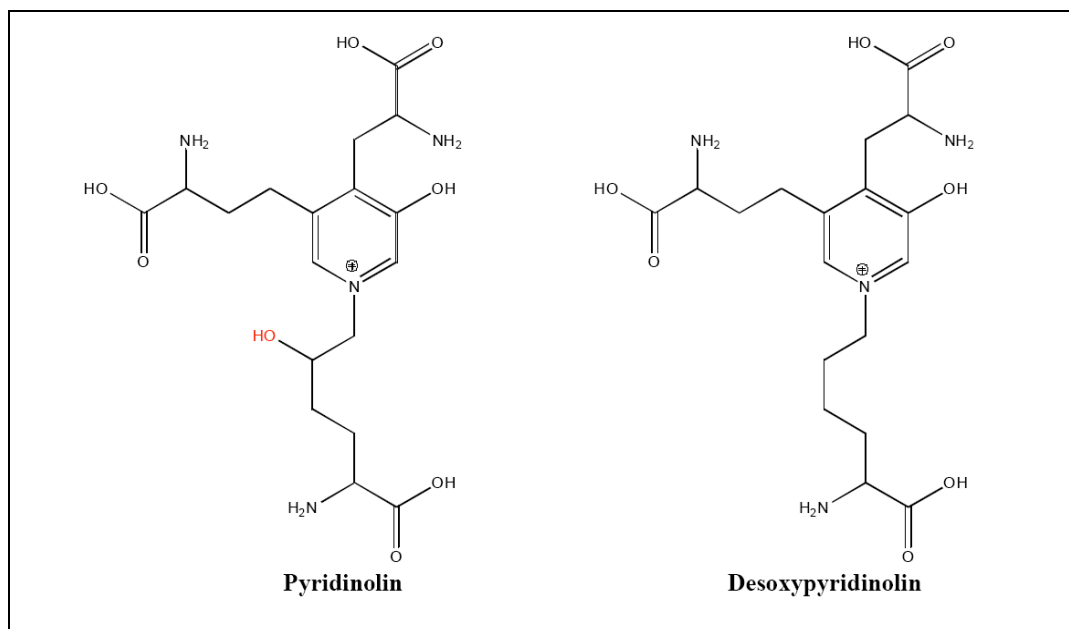


Abbildung 1: Strukturformel der Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin (modifiziert nach Kummer 2007)

Pyridinolin ist nachweisbarer Bestandteil von Gelenkknorpel (Kollagen II), Knochen, Gefäßen, Synovia und Sehnen (Kollagen I), während Desoxypyridinolin vorrangig im Knochenkollagen und im Dentin vorhanden ist. Da jedoch der Kollagenumsatz in Sehnen/Dentin/Gefäßen im Vergleich zu Knochen/Knorpel vernachlässigbar klein ist, können Pyd und DPyd als weitgehend spezifische Marker für Knochen- und Knorpelmatrix betrachtet werden. Es zeigt sich ein Pyd/DPyd-Verhältnis von 50:1 im Knorpel, 25:1 im Synovialgewebe und 3:1 im Knochen (Takahashi et al. 1996). So ist der Pyd/DPyd-Quotient ein relativer Indikator für die unterschiedliche Herkunft der Crosslinks. Je höher der Quotient, desto größer der Anteil durch chondrogene Degradation.

Der quantitative Nachweis von Pyd und DPyd beruht auf der natürlichen Fluoreszenz der Pyridiniumderivate. Referenzmethode ist die HPLC (High Performance Liquid Chromatography) nach vorheriger Aufbereitung des Analysates durch Hydrolyse und

Partitionschromatographie. Durch die Hydrolyse werden die proteingebundenen Crosslinks freigesetzt. Aufgrund struktureller Unterschiede und Polaritätsunterschiede sind beide durch chromatographische Verfahren trennbar (Black et al. 1988).

Studien konnten zeigen, dass Probenmaterial über mehrere Jahre unter -20°C aufbewahrt werden kann, ohne dass sich die Konzentrationen der Crosslinks ändern, auch wiederholtes Auftauen wirkt sich nicht auf die Höhe der Spiegel aus (Colwell et al. 1996).

Alternativ zur HPLC kann auch eine Bestimmung mit Hilfe der ELISA Technik (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) erfolgen, sie ist jedoch anfälliger für Kreuzreaktionen (Hein et al. 1997).

Die übliche Bestimmung der Crosslinks erfolgt aus Urin oder Serum, aber auch Synovialflüssigkeit, Synovia und Knochen können als Untersuchungsmaterial dienen. Die Konzentrationsbestimmung in der Synovialflüssigkeit kann im Vergleich zu Urin und Serum nützlicher sein, um die genaueren Vorgänge der Degradationsprozesse und Erosionen des Knorpels zu ermitteln (Hein et al. 1997), die gerade bei der RA von Bedeutung sind.

Die Urinausscheidung unterliegt tageszeitlichen Schwankungen, mit hohen Werten in den frühen Morgenstunden (Schmidt-Gayk 1996). Studien zufolge ist die Elimination bis zu einem gewissen Grad unabhängig von der Nierenfunktion (Astbury et al. 1994). Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz konnten deutlich erhöhte Pyd- und DPyd-Level in Serum und Urin im Vergleich zu Gesunden erhoben werden, dies gilt ebenso für Serumwerte bei Dialysepatienten mit chronischer Niereninsuffizienz (Muller et al. 1999).

Auch im Rahmen des normalen Knochen- und Knorpelstoffwechsels kommt es zu Abbauvorgängen des Kollagens, so dass auch bei Gesunden Pyd und DPyd im Urin nachgewiesen werden können. Die renale Ausscheidung von Pyd und DPyd liegt beim gesunden Erwachsenen innerhalb eines vergleichsweise engen Normbereichs. Alter, Geschlecht, Diät und körperliche Aktivität beeinflussen die im 24-Stunden- oder Spontanurin gemessenen Werte nicht signifikant (Seibel et al. 1989, Beardsworth et al. 1990). Aufgrund des temporär beschleunigten Knochenumsatzes zeigen jedoch Frauen während der frühen Menopause durchschnittlich 2- bis 3-fach höhere Urinkonzentrationen von Pyd und DPyd (Uebelhart et al. 1991), die im weiteren Verlauf der Postmenopause meist wieder auf prämenopausale Werte zurück gehen.

In Abhängigkeit vom Alter finden sich bei Kindern und Heranwachsenden für beide Komponenten höhere Werte im Urin (Muller et al. 2003), die den gesteigerten Knochenumsatz während des skelettalen Wachstums reflektieren.

Die Ausscheidung beider Crosslinks ist bei einer Vielzahl primärer und sekundärer Knochenerkrankungen deutlich verändert, z. B. postmenopausale Osteoporose, primärer Hyperparathyreoidismus, Morbus Paget. Auch bei Tumorpatienten können gesteigerte Pyridinium-Crosslinks Hinweise auf Knochenmetastasen geben. (Seibel et al. 1992)

Möglicherweise liefern die beiden Crosslinks wichtige Anhaltspunkte zur unterschiedlichen Pathogenese der verschiedenen rheumatischen Erkrankungen.

Zahlreiche Untersuchungen konnten auch bei der RA Assoziationen mit den Quervernetzungscomponenten belegen. So zeigten sich erhöhte Pyd- und DPyd-Werte im Urin bei RA-Patienten, die in vielen Studien mit der rheumatischen Krankheitsaktivität korrelierten (Muller et al. 2003, Gough et al. 1994, Kameyama et al. 2000, Seibel et al. 1989). Bei der RA kommt ein überwiegender Teil, der im Urin ausgeschiedenen Pyridinoline aus dem Gelenkknorpel und nicht aus dem Knochen, der eigentlichen physiologischen Hauptquelle.

Auch im Serum von RA Patienten lassen sich erhöhte Crosslinkspiegel detektieren (Furumitsu et al. 2000), ebenso in der Synovialflüssigkeit. So konnten Sinigaglia et al. für Pyd und Müller et al. sowohl für Pyd als auch für DPyd gesteigerte Werte belegen (Sinigaglia et al. 1995, Muller et al. 1996). Zudem konnten im Synovialgewebe von Patienten mit aktiver RA erhöhte Pyd- und DPyd-Spiegel nachgewiesen werden, was eine vermehrte Crosslink-Dichte im reifen Kollagen bei aktiver RA vermuten lässt (Kaufmann et al. 2003). Die Arbeitsgruppe fand im Weiteren auch statistisch signifikante Zusammenhänge für Pyd und den Quotienten Pyd/DPyd zwischen Synovia, Serum und Urin.

Manicourt et al. vermuten, dass TNF- α und andere proinflammatorische Zytokine an der gesteigerten Degradation des Knorpels bei RA beteiligt sind, denn sie zeigten eine Korrelation von TNF- α und IL-6 mit Pyd in der Synovialflüssigkeit (Manicourt et al. 2000).

2.2.3 Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP)

Die EZM des Knorpels wird von Chondrozyten synthetisiert und besteht neben Kollagenen (Hauptkollagen Typ II) und Proteoglykanen auch aus nichtkollagenen Proteinen. Obwohl die nichtkollagenen Proteine bisher spärlich charakterisiert sind,

scheinen sie wichtige strukturelle und biologische Funktionen zu haben. Durch Interaktionen mit anderen Komponenten der EZM können sie die supramolekulare Zusammensetzung der Knorpelmatrix beeinflussen und haben damit Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften des Gewebes. Durch direkten Zellkontakt z.B. mit Chondrozyten können sie auch auf zelluläre Funktionen wirken (DiCesare et al. 1994). COMP ist ein solches nichtkollagenes Protein. Es wurde 1992 erstmalig von Hedbom und seiner Forschungsgruppe beschrieben, die es aus bovinen Knorpel isolieren konnten (Hedbom et al. 1992). Die Molekularmasse des oligomeren Proteins beträgt ca. 524 kDa, es setzt sich aus 5 Monomeren von je 100-120 kDa zusammen. Aufgrund der Aminosäuresequenzhomologie gehört es zur Familie der Thrombospondine (Oldberg et al. 1992). Die Untereinheiten sind am N-terminalen Ende über Disulfidbrücken gekoppelt, während C-terminal die Möglichkeit besteht, mit dem Kollagennetzwerk in Verbindung zu treten. Sie enthalten auch Kalzium-Bindungs-Domänen, was vermuten lässt, dass zur Interaktion von COMP mit anderen Matrixkomponenten das Kalzium eine Rolle spielen könnte (Recklies et al. 1998). Das Gen für COMP ist auf Chromosom 19p13.1 codiert, Mutationen können zu Pseudocondroplasie, multipler epiphysärer Dysplasie und Kleinwuchs mit Knorpelabnormalitäten führen (Zaia et al. 1997).

Der quantitativ größte Anteil des COMP findet sich im Knorpel. Anfangs ging man davon aus, dass es nur dort vorkommt, mittlerweile wurden aber geringe Mengen auch in anderen Geweben nachgewiesen. Dazu gehören zum Beispiel Sehnen, Bänder, Meniskus und Synovialmembran (Di Cesare et al. 1997, Recklies et al. 1998). Im menschlichen Körper sind die höchsten COMP-Spiegel im Meniskus und Gelenkknorpel, die niedrigsten in Rippen und Trachea gemessen wurden (Neidhart et al. 1997). Im adulten Knorpelgewebe ist es vor allem in der interterritorialen Matrix lokalisiert. Die Produktion erfolgt durch zelluläre Bestandteile der jeweiligen EZM, im Knorpel also überwiegend durch Chondrozyten. Allerdings konnten verschiedene in-vitro-Studien zeigen, dass auch andere mesenchymale Zellreihen wie Synoviozyten und dermale Fibroblasten in der Lage sind, enorme Mengen an COMP zu synthetisieren (Recklies et al. 1998, Dodge et al. 1998).

Die Funktion des Moleküls ist bisher noch nicht bis ins Detail verstanden. Aufgrund der Störungen, die aus genetischen Defekten von COMP resultieren, nimmt man an, dass es an der Chondrogenese beteiligt ist. Auch die Gewebeintegrität und -stabilität wird von COMP mit beeinflusst. Es vermittelt die Adhäsion von Chondrozyten an Knorpel-

Matrix-Proteine (DiCesare et al. 1994) und stabilisiert die EZM durch Interaktionen mit Matrixkomponenten wie Kollagen Typ II.

Beim Abbau von Gelenkknorpel im Rahmen pathologischer Prozesse, die entzündlich, degenerativ oder traumatisch sein können, wird COMP in die Gelenkflüssigkeit freigesetzt (Neidhart et al. 1997, Di Cesare et al. 1996).

Aufgrund der Eigenschaften wurde in den letzten Jahren versucht, COMP als Marker der Krankheitsaktivität und des Knorpelabbaus bei RA zu nutzen (Marti et al. 1999, Mansson et al. 2001, Mansson et al. 1997, Mansson et al. 1995). Ebenso wurde es in der Überwachung der Therapie eingesetzt (Crnkic et al. 2003, Weitoft et al. 2005). Als Probenmaterial diente dabei Serum oder Synovialflüssigkeit. COMP könnte in der Frühdiagnostik oder in dem Erkennen von schweren Verläufen von Bedeutung sein.

2.3 Advanced Glycation Endproducts (AGEs)

2.3.1 Begriff und Historie

Schon 1912 beschrieb der französische Biochemiker Louis-Camille Maillard den komplexen chemischen Prozess, bei dem nach der Reaktion von Zucker mit Proteinen nicht mehr abbaubare langkettige Verbindungen entstehen, die sogenannte „Maillard-Reaktion“. Lange Zeit wurden seine Ergebnisse in der biomedizinischen Forschung kaum beachtet. Lediglich die Lebensmittelchemie interessierte sich für die Prozesse, die während Back-, Koch- oder Bratvorgängen ablaufen und zur Bräunung der Nahrungsmittel führen. Erst Mitte des vergangenen Jahrhunderts wurde mit der Entdeckung des glykierten Hämoglobins (HbA1c) deutlich, dass solche Prozesse auch in vivo bedeutsam sind.

Die Produkte der Maillard-Reaktion werden heute auch als „advanced glycation endproducts“ (AGEs) bezeichnet. Die wesentlichen Schritte der Generierung von AGEs laufen ohne die Beteiligung von Enzymen ab (Brownlee et al. 1988). Die deutsche Bezeichnung für den Prozess lautet deshalb „nicht enzymatische Glykierung“. Im Gegensatz zu glykosylierten Proteinen enthalten glykierte keine glykosidischen Bindungen. Der Vorgang kann sowohl Proteine als auch Phospholipide und Nukleinsäuren betreffen (Nawroth et al. 1999, Bucala et al. 1993, Bucala et al. 1984).

2.3.2 Biochemie

Die biochemischen Vorgänge der AGE-Bildung sind sehr komplex und teilweise noch unverstanden. Im ersten Schritt reagieren reduzierende Zuckerverbindungen (vor allem Glucose) in der offenen Aldehydform nicht enzymatisch mit freien N-terminalen und ϵ -ständigen Aminogruppen von Proteinen. Es entstehen labile Aldimine, auch Schiffsbasen genannt. Durch Umlagerung in die stabile Ketoform werden aus den Aldimininen die Ketoamine (Amadori-Produkte). Diese Reaktion ist noch reversibel. In weiteren chemischen Reaktionen wie Oxidations-, Eliminations- und Kondensationsreaktionen werden die Ketoamine in verschiedene Intermediate umgebaut. Diese können erneut mit Aminogruppen reagieren, was zur Bildung irreversibler quervernetzter AGE-Strukturen führt (Bierhaus et al. 1998). Die verschiedenen Reaktionsschritte sind in Abbildung 2 dargestellt. Die Intermediatbildung kann sowohl unter oxidativen als auch unter nicht oxidativen Bedingungen ablaufen (Singh et al. 2001). Auch direkte metall-katalysierte Autooxidation von Kohlehydraten kann zur Formierung von reaktiven Zwischenprodukten führen (Nawroth et al. 1999). Bei dieser Reaktion entstehen Superoxidradikale und das Gewebe wird einem oxidativen Stress ausgesetzt (Hunt et al. 1988).

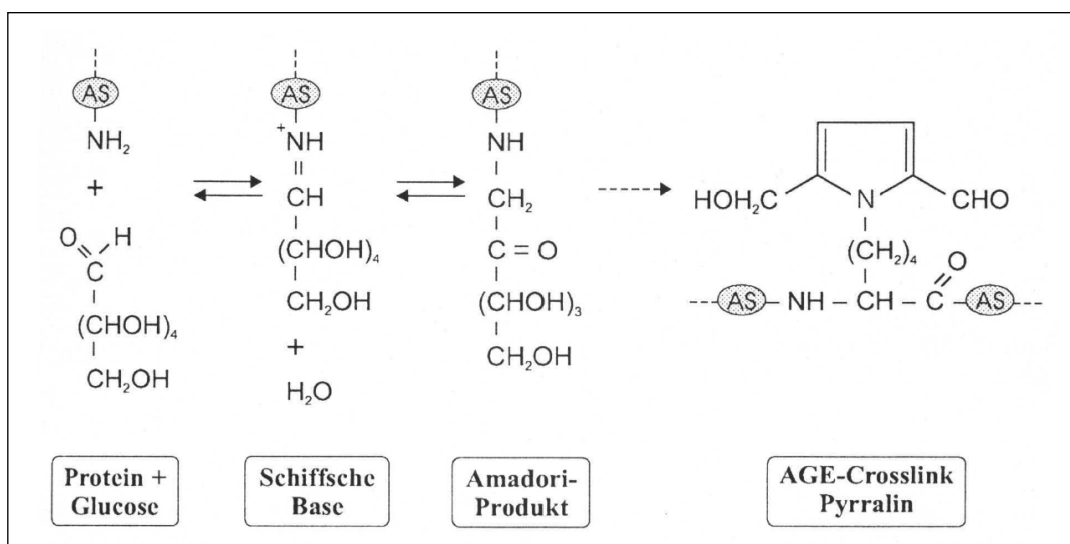


Abbildung 2: Reaktionsschritte der AGE-Bildung (modifiziert nach Koehler 2005)

Die AGE-Bildung selbst wird durch das Vorhandensein von oxidativem Stress begünstigt. Dadurch können auch im „normalen“ Kohlenhydrat-, Lipid- und Aminosäure-Stoffwechsel reaktive Carbonylverbindungen entstehen, die AGE-Präkursoren darstellen. Die Begriffe „Advanced Glycation End-Products“ (AGEs) und „Advanced Lipoxidation End-Products“ (ALEs) unterscheiden zwischen Maillard-Endprodukten, die sich aus Kohlenhydrat- bzw. Lipid-Intermediaten ableiten. Pentosidin ist beispielsweise ein reines AGE, während CML als AGE/ALE klassifiziert ist, da auch die Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren zur CML-Bildung führen kann (Baynes 2001). Es sind also komplexe Prozesse an der Entstehung von AGE-modifizierten Proteinen beteiligt.

Die ablaufende AGE-Bildung ist unter anderem von der Menge und Struktur des zu glykierenden Substrates abhängig aber auch von der Höhe und Dauer der einwirkenden Zuckerkonzentration. Von den natürlich vorkommenden Zuckern hat Glucose die geringste Glykierungsrate. Die intrazellulären Zucker wie Fructose, Threose und Glucose-6-Phosphat können schneller AGE-Strukturen formieren (Suarez et al. 1989, Bunn und Higgins 1981).

Typische Eigenschaften der AGEs sind die gelblich-bräunliche Farbe, die Fähigkeit zur Eigenfluoreszenz, verminderte Löslichkeit und Elastizität sowie die Bildung von komplexen Quervernetzungen – den Crosslinks. Dadurch kommt es zur Änderung der physikochemischen Eigenschaften der betroffenen Moleküle und zu Modifikationen an der extrazellulären Matrix (Brownlee 1992, Bailey et al. 1995). Die glykierten Endprodukte zeichnen sich durch eine erhöhte Proteaseresistenz aus.

An der zellulären Aufnahme und dem Abbau von AGE-modifizierten Proteinen sind spezielle AGE-Rezeptoren (RAGE) beteiligt. Im Rahmen von Gewebsumbauprozessen kommt es zur Aktivierung von Monozyten und Makrophagen, die über RAGE die AGEs aufnehmen und sie lysosomal verstoffwechseln. Die Spaltprodukte (lösliche AGEs) werden danach in die Zirkulation freigesetzt und renal eliminiert (Singh et al. 2001, Nawroth et al. 1999). Im Rahmen von Funktionsstörungen der Niere kann es zur Anreicherung von AGEs im Blut und in verschiedenen Geweben kommen (Miyata et al. 1996c). Zirkulierende AGEs könnten durch Reaktion mit Plasma- und Gewebekomponenten zur Entstehung von AGEs der 2. Generation führen (Nawroth et al. 1999, Bucala et al. 1994). Zusätzlich zu den endogen gebildeten AGEs nimmt der Mensch auch mit der täglichen Nahrung oder durch Tabakkonsum eine gewisse Menge solcher Verbindungen auf. In welchem Umfang die exogen zugeführten AGEs zur

Modifikation von Plasma- und Gewebeproteinen beitragen können ist noch nicht vollständig geklärt (Singh et al. 2001)

Die genaue chemische Struktur der AGEs ist bisher nur von wenigen Verbindungen bekannt. Die am besten analysierten sind das Pentosidin und das CML, deren Strukturformeln in Abbildung 3 dargestellt sind. Pentosidin ist ein Lysin-Arginin-Crosslink, CML ein Lysin-Addukt. Beide entstehen unter oxidativen Bedingungen. Circa 90 % der Pentosidine und des CML sind an Albumin gebunden, 10 % kommen in freier Form vor. Diese beiden Substanzen wurden auch in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Aufgrund der zum Teil sehr unterschiedlichen Strukturen der AGEs gibt es noch keine einheitliche Nachweismethode. In erster Linie erfolgen Bestimmungen mittels HPLC und ELISA-Techniken.

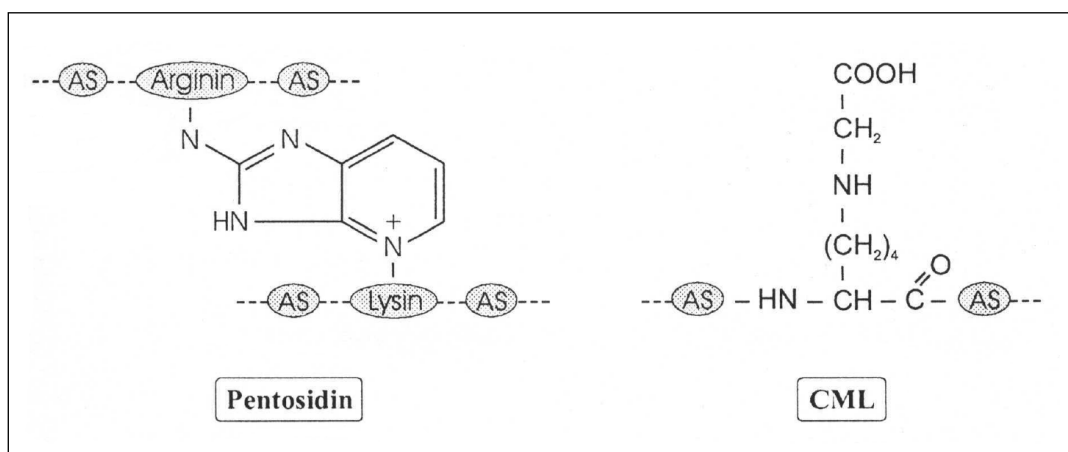


Abbildung 3: Strukturformeln von Pentosidin und CML (modifiziert nach Koehler 2005)

2.3.3 AGEs und Rezeptorinteraktion

Effekte auf die Zellen vermitteln die AGEs über zahlreiche Rezeptoren, wie z. B. RAGE, AGE-Rezeptor Typ I – III, Scavenger-Rezeptoren und Lysozym (Vlassara und Palace 2002). Der am besten charakterisierte Rezeptor ist RAGE, ein transmembraner Multiligandenrezeptor der Immunglobulin-Superfamilie mit einem Molekulargewicht von 35 kDa. Er kommt auf nahezu allen Zellen des menschlichen Organismus vor.

AGE–RAGE–Interaktion löst intrazellulär Signalmechanismen aus, die zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen und oxidativem Stress führen. Außerdem werden Kinasen

aktiviert, die zur Phosphorylierung und Degradation von I- κ B führen. Dadurch wird wiederum der Transkriptionsfaktor NF- κ B und die entsprechenden Gene aktiviert.

So kommt es zur Expressionsinduktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 α , IL-6 und TNF- α , von prokoagulatorischen Faktoren wie Tissue-Factor und Thrombomodulin, von Vasokonstriktoren wie Endothelin-1 und Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 (Singh et al. 2001). Diese Botenstoffe sind wichtige Faktoren bei verschiedenen chronischen Erkrankungen, wie z. B. der RA.

RAGEs binden aber nicht nur AGEs, sondern auch andere Proteine wie Amphoterin, Amyloid- β -Peptide und Serum-Amyloid A. Im Vergleich zu anderen Rezeptoren bewirkt die Ligandenbindung an RAGE eine langdauernde Aktivierung und Stimulierung der Zelle.

Man versucht, therapeutische Ansätze zu entwickeln, um in das AGE-RAGE-System einzugreifen (Bierhaus et al. 1998). Möglichkeiten dafür sind die Hemmung der AGE-Bildung durch Antioxidantien oder Aminoguanidine. Letztgenannte Verbindungen reagieren mit der terminalen Aminogruppe und verhindern dadurch die Quervernetzung. Andere Therapieansätze versuchen die Quervernetzungen durch Crosslink-Breaker wie *N*-phenacylthiazoliumbromide aufzuspalten. Im Tiermodellversuch ist es gelungen, durch den Einsatz von löslichen RAGE (sRAGE) die proinflammatorische Rezeptoraktivierung zu blockieren. Dabei konkurriert sRAGE mit AGE um die Rezeptorbindung. (Smit und Lutgers 2004)

Die Verfahren sind allerdings noch nicht so ausgereift, dass sie therapeutisch zum Einsatz kommen können.

2.3.4 AGEs und Erkrankungen

Es ist bekannt, dass es mit zunehmendem Alter zu einer Akkumulation der AGEs vor allem in Geweben mit langlebigen Proteinen kommt (Baynes 2001). Es gibt aber auch verschiedene Erkrankungen, wie z. B. Atherosklerose, Diabetes mellitus und chronische Niereninsuffizienz, die mit erhöhtem oxidativen Stress und Carbonylstress einhergehen (Kalousova et al. 2005). Bei diesen Erkrankungen können die AGEs in der Pathogenese bedeutsam sein.

Da die Ausscheidung der AGE-Abbauprodukte renal erfolgt, kommt es bei Niereninsuffizienz und Urämie zur Akkumulation (Miyata et al. 1996c, Haley und Ward 1986). Bei Dialysepatienten stellt die Entwicklung einer Amyloidose eine Langzeitkomplikation dar, die überwiegend Gelenke und Knochen betrifft. Bei der

Entstehung scheint AGE-modifiziertes β -2-Mikroglobulin eine Rolle zu spielen, wenngleich der exakte Mechanismus noch unklar ist (Miyata et al. 1994, Miyata et al. 1996b, Jaradat et al. 2001, Moe et al. 2000).

Erste Hinweise auf eine vermehrte AGE-Bildung wurden bei Untersuchungen an Diabetes-Patienten entdeckt. Erhöhte Blutglucosespiegel begünstigen die AGE-Entstehung. Die vielfältigen Komplikationen der Erkrankung wie diabetische Mikro- und Makroangiopathie, Retinopathie, Neuropathie und Nephropathie stehen mit den AGEs in Zusammenhang (Vlassara und Palace 2002, Smulders et al. 1998, Friedman 1999, Makita et al. 1991). So kann zum Beispiel AGE-modifiziertes Kollagen zur Pathogenese der diabetischen Nephropathie beitragen (Makino et al. 1996).

Bei Erkrankungen der Gefäße wie Atherosklerose sind die AGEs ebenso bedeutsam. Sie verursachen oxidativen Stress und über die RAGE-Bindung proinflammatorische Effekte (Vlassara 1996, Schmidt et al. 1994, Makita et al. 1996, Kalousova et al. 2005). Sie verändern auch LDL-Partikel und erhöhen dadurch das atherogene Potential (Bucala et al. 1994).

Vermehrte AGE-Ablagerungen und RAGE-Aktivierung werden auch bei neurodegenerativen Erkrankungen gefunden, z. B. in senilen Plaques bei Morbus Alzheimer (Colaco et al. 1996). Auch im Liquor bei Patienten mit vaskulärer Demenz und Morbus Alzheimer zeigen sich erhöhte Werte (Bar et al. 2003). Oxidativer Stress und AGE-Formation scheinen auch in der Pathogenese des Morbus Parkinson wichtig zu sein (Castellani et al. 1996), ebenso bei Morbus Pick (Kimura et al. 1996).

Auch Augenerkrankungen wie Keratokonus (Dawczynski et al. 2002) und Katarakt (Argirova und Breipohl 2002, Ahmed et al. 1997) werden in Zusammenhang mit AGEs gebracht. Lisenkristalline sind ein optimales Ziel für Glykierungsreaktionen, da sie zu den langlebigsten Proteinen des Körpers gehören.

Bei muskuloskelettalen Erkrankungen wurde der Zusammenhang mit AGEs ebenfalls untersucht. Die AGE-Modifizierung von Kollagen im Knorpel führt zu Veränderungen der physikalischen Eigenschaften wie Elastizität, Dehnbarkeit und Festigkeit (Verzijl et al. 2002, DeGroot et al. 2001b). Neben den mechanischen Eigenschaften werden auch biochemische Prozesse verändert. Es kommt zum erhöhten chondrozytären Proteoglykan-Abbau bei gleichzeitig verminderter Neusynthese. Die EZM ist außerdem anfälliger gegen den Abbau durch MMPs (Saudek und Kay 2003).

Knochen, der durch AGEs umgewandelt wurde, unterliegt einer gesteigerten Resorption durch Osteoklasten (Miyata et al. 1997). Anhand histomorphologischer Parameter

konnte gezeigt werden, dass Pentosidin über eine Aktivierung der Osteoklasten die Knochenresorption fördert. Bei Osteoporosepatienten zeigten sich signifikant höhere Serum-AGE-Spiegel als in der gesunden Kontrollgruppe (Hein et al. 2003). Dass AGEs bei Osteoporose eine Rolle spielen, wird durch experimentelle Befunde unterstützt. Auf Osteoblasten-ähnlichen Kulturzellen konnte RAGE nachgewiesen werden. Solche Zellen zeigen unter Einfluss von AGE-modifiziertem Rinder-Albumin eine reduzierte Synthese von Kollagen Typ I sowie Osteocalcin (Yamamoto et al. 2001). Weiterhin wird die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten durch AGE-verändertes Kollagen beeinflusst (McCarthy et al. 2001). Es scheint ein breites Spektrum an Möglichkeiten zu geben wie AGEs die Qualität des Knochens beeinflussen können und damit zur Entwicklung der Osteoporose beitragen (Hein 2006). Dabei scheint die Glykierung von Knochenproteinen auf beide Prozesse des Knochenremodelings, also den Abbau durch Osteoklasten und den Aufbau durch Osteoblasten, Einfluss zu nehmen (Hein et al. 2006). Eine Studie von Franke et al. zeigte, dass AGEs die mRNA-Expression von RAGE, RANKL und Osterix in Osteoblasten erhöhen und die von alkalischer Phosphatase und Osteocalcin vermindern (Franke et al. 2007). Dadurch wird die Osteoblastenfunktion verändert, die Osteoklastogenese gesteigert und die Matrix-Mineralisation verschlechtert.

Bei Patienten mit Fibromyalgie wurden ebenfalls erhöhte Pentosidin- und CML-Spiegel im Serum und pathologische Anreicherungen von CML im interstitiellen Bindegewebe der Muskulatur ermittelt, was ein Hinweis für die pathogenetische Bedeutung bei dieser Erkrankung sein könnte (Hein und Franke 2002, Ruster et al. 2005).

2.3.5 AGEs und RA

Auch bei chronisch-rheumatischen Erkrankungen wird die AGE-Bildung als eine mögliche Ursache für die Veränderung des Kollagengewebes angesehen und ihr dadurch eine pathogenetische Bedeutung beigemessen. Oxidativer Stress spielt in der Pathogenese der RA ebenso eine Rolle.

Es gibt einige Arbeiten, die sich vor allem mit den Pentosidin-Spiegeln in verschiedenen Körperflüssigkeiten bei RA auseinandersetzen. Takahashi fand 1997 bei RA-Patienten erhöhte Pentosidin-Spiegel im Serum und Urin im Vergleich zu gesunden Personen. Diese korrelierten mit dem CRP, der BSG, den RF, dem Gelenkstatus und der Krankheitsaktivität (Takahashi et al. 1997). Die 1998 von Miyata veröffentlichte Studie zeigte ebenfalls signifikant erhöhte Spiegel im Plasma von RA-Patienten im Vergleich

zu Patienten mit Arthrose, Diabetes mellitus oder Gesunden. Auch die Synovialflüssigkeitsspiegel waren bei den RA-Probanden höher als in der Arthrose-Gruppe und es lagen Korrelationen des Plasmapentosidins mit CRP, BSG, Leukozyten und Thrombozyten in der RA-Gruppe vor (Miyata et al. 1998).

Die spanische Arbeitsgruppe um Rodriguez-Garcia veröffentlichte 1998 ebenfalls eine Studie, in der sie nachweisen konnten, dass RA-Patienten erhöhte Pentosidin-Level im Serum aufweisen, und dass der Pentosidin-Spiegel bei Gesunden mit dem Alter korreliert, bei RA-Patienten allerdings nicht (Rodriguez-Garcia et al. 1998).

In der Untersuchung der Synovialflüssigkeit konnte Chen zeigen, dass bei RA erhöhte Pentosidin-Werte im Vergleich zur Arthrose vorliegen, der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die positiven Korrelationen zwischen Pentosidin und CRP, BSG, der Morgensteifigkeit bzw. der Krankheitsaktivität erreichten allerdings Signifikanz (Chen et al. 1998). In einer Studie, die ein Jahr später vom selben Autor veröffentlicht wurde, konnten bei RA-Erkrankten signifikant erhöhte Serum- und Synovialspiegel von Pentosidin im Vergleich zu Arthrose-Erkrankten demonstriert werden. Im Urin war der Unterschied allerdings nicht signifikant. Sowohl bei der RA als auch bei der Arthrose korrelierten die Serum-, Urin-, und Synovialflüssigkeitsspiegel untereinander signifikant positiv (Chen et al. 1999).

Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe wiesen signifikant höhere Pentosidin-Serumspiegel bei RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden nach. Die Konzentrationen im Serum und der Synovialflüssigkeit unterschieden sich nicht. Rheumafaktor-positive Patienten hatten höhere Pentosidin-Spiegel als Rheumafaktor-negative. Es ergaben sich signifikante Korrelationen der Pentosidinserumspiegel zu Inflammationsmarkern wie IL-6, BSG und CRP (Hein et al. 2005).

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei RA-Patienten die Pentosidin-Spiegel im Serum, Urin und in der Synovialflüssigkeit sowohl gegenüber gesunden Vergleichspersonen als auch gegenüber Arthrose-Patienten und Diabetes mellitus Patienten erhöht sind. Die Pentosidin-Spiegel in verschiedenen Körperflüssigkeiten korrelieren positiv miteinander. Außerdem stehen sie in Verbindung mit der Krankheitsaktivität und mit Entzündungsmarkern.

Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnten außerdem zum ersten Mal eine AGE-Akkumulation in der rheumatoiden Synovialis zeigen. CML wurde in der synovialen Deckzellschicht, der darunter liegenden Schicht und im Endothel synovialer Gefäße bei RA- und OA-Patienten detektiert. In Gewebeproben von Gesunden hingegen

konnte CML lediglich in geringem Umfang in synovialen Endothelzellen nachgewiesen werden. N-ε-Carboxymethyl-Lysin war in Makrophagen und aktivierten T-Zellen, nicht jedoch in B-Zellen zu finden (Drinda et al. 2002). Analog zu den Ergebnissen wurde RAGE im Synovialgewebe von Patienten mit RA und Arthrose in der synovialen Deckzellschicht und an Stromazellen nachgewiesen. Bei RA wurde RAGE auf Makrophagen, T-Zellen und nur ganz vereinzelt auf B-Zellen gefunden (Drinda et al. 2005).

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass AGEs aus Entzündungsprozessen resultieren und selbst die Inflammation aufrechterhalten. Dabei spielen sowohl die Änderung der Antigenstruktur von verschiedenen Gewebekomponenten eine Rolle, als auch die AGE-RAGE-Interaktion mit NF-κB-Aktivierung und vermehrter Bildung proinflammatorischer Moleküle (Drinda et al. 2005).

AGEs können auch Immunglobuline der Klasse G modifizieren (IgG-AGE), was wiederum zu einer Antikörperreaktion führen kann. Es bilden sich Antikörper (AK) der Klasse IgM oder IgA gegen IgG-AGE. Der Arbeitsgruppe um Newkirk gelang es, erhöhte IgG-AGEs bei RA-Patienten im Vergleich zu Diabetikern und Gesunden nachzuweisen. Sie konnten einen schweren Krankheitsverlauf bei Patienten mit zirkulierenden anti-IgG-AGE-AK erkennen (Newkirk et al. 1998). Die Krankheitsaktivität korrelierte auch signifikant mit den IgM-anti-IgG-AGE, so dass diese Antikörper eventuell neue Aktivitätsmarker darstellen könnten (Lucey et al. 2000)

Zusammenfassend scheint die AGE-Modifizierung von Proteinen bei der RA zur Unterhaltung chronisch-entzündlicher Mechanismen beizutragen und Knorpel- und Knochendestruktionsprozesse zu fördern.

3 Ziele der Arbeit

Die RA ist eine chronische Systemerkrankung, die unbehandelt zu schweren Destruktionen und Funktionseinschränkungen an kleinen und großen Gelenken führen kann. Hinsichtlich der Pathogenese und des gesteigerten Knochen-Knorpel-Umbauprozesses existieren weiterhin viele offene Fragen.

Biochemische Marker können bei der Klärung hilfreich sein. Die Kollagen-Crosslinks Pyridinolin und Desoxypyridinolin sowie COMP stellen wichtige Abbaumarker des Knorpel- und Knochengewebes dar.

Während chronisch-entzündlicher Prozesse kommt es zu einer intensiven Generation und Akkumulation von Advanced Glycation Endproducts (AGEs), besonders in langlebigen Proteinen wie Kollagen.

Es kann die Arbeitshypothese aufgestellt werden, dass eine vermehrte AGE-Modifizierung von Knochen- und Knorpelkollagen bei der RA die Degradations- und Destruktionsaktivitäten in entsprechenden Geweben verstärkt. Somit könnte die Proteinmodifizierung mittels AGEs (vergleichbar mit der Citrullinierung von Proteinen) ein pathogenetisch bedeutsames Phänomen der RA sein.

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist deshalb, ob sich relevante Zusammenhänge zwischen den AGE-Spiegeln Pentosidin bzw. CML in der Synovialflüssigkeit einerseits und den Markern des Knorpel- bzw. Knochenabbaus (COMP, Pyd, DPyd) andererseits ergeben.

Nebenbefundlich soll außerdem untersucht werden, ob die folgenden Fragestellungen zutreffen:

- Gibt es Zusammenhänge zwischen den Crosslinks Pyridinolin, Desoxypyridinolin und COMP in der Synovialflüssigkeit?
- Bestehen Beziehungen zwischen den AGEs Pentosidin und CML in der Synovia?
- Hat das Alter Einfluss auf die verschiedenen Parameter?
- Existieren geschlechtsspezifische Unterschiede der Markerkonzentrationen oder möglicher Zusammenhänge?

4 Material und Methoden

4.1 Patientenkollektiv

Für die Untersuchung wurden 51 Patienten mit RA, die sich im Funktionsbereich Rheumatologie/Osteologie der Klinik für Innere Medizin III der Friedrich-Schiller-Universität in Behandlung befanden, ausgewählt. Die Diagnosestellung RA erfolgte nach den Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) von 1988 (Arnett et al. 1988), vgl. Abschnitt 2.1.6.

Das Geschlechtsverhältnis Frauen zu Männer betrug 68,6% zu 31,4% (2,18:1). Das Durchschnittsalter bei Probeentnahme lag bei 55,85 Jahren, siehe dazu auch Tabelle 8.

Tabelle 8: Geschlechtsverteilung und Altersstruktur im Patientenkollektiv

Geschlecht	Personenanzahl	Alter in Jahren		
		Mittelwert	Standardabweichung	Median
weiblich	35	56,94	15,023	59
männlich	16	53,44	14,25	52
gesamt	51	55,84	14,734	58

4.2 Material

Als Untersuchungsmaterial diente Synovialflüssigkeit, welche durch eine Kniegelenkspunktion gewonnen wurde. Die Punktion war unabhängig von der Studie indiziert. Die Proben wurden bei -80 °C eingefroren, um sie haltbar zu machen. Die Entnahmen erstreckten sich auf einen Zeitraum von 1994 bis 2004.

Aus diesem Material wurden die Crosslinks, das COMP und die AGEs in Doppelbestimmung sowie das Protein ermittelt.

Eine Einverständniserklärung der Patienten und ein positives Votum der Ethikkommission (Bearbeitungsnummer 1725-02/06) lagen vor.

4.3 Bestimmung der Crosslinks Pyd, DPyd und des COMP

Die mir zur Verfügung gestellten Werte der Crosslinks Pyd, DPyd und COMP waren im Forschungslabor für Rheumatologie und Osteologie nach dem im Folgenden erläuterten Verfahren ermittelt worden.

4.3.1 Pyd und DPyd

Die Analyse erfolgte nach der von Müller 1996 in Anlehnung an James (James et al. 1993) und Colwell (Colwell et al. 1993) beschriebenen High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Methode (Muller et al. 1996).

Das Verfahren der HPLC ist eine physikalisch-chemische Methode zur Trennung von Stoffgemischen. Die Probenflüssigkeit wird mittels einer flüssigen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert. Voraussetzung zur Anwendung ist die vollständige Lösung der Stoffgemische. Der eigentliche Trennvorgang erfolgt durch verschiedene Prinzipien der Absorptions-, Verteilungs- und Ionenaustauschchromatographie. Die in der mobilen Phase gelöste Probe wird mit konstanter Fließgeschwindigkeit durch die Trennsäule transportiert. Diese stationäre Phase besteht aus einem dichten Verband poröser Teilchen, welche mit unterschiedlichen Anziehungskräften aufgrund unterschiedlicher Polarität auf die einzelnen Komponenten des Stoffgemisches wirken. Entsprechend ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften werden die Substanzen unterschiedlich lang absorbiert bzw. retiniert. Am Säulenende erfolgt die Detektion der getrennten Substanzen.

Das Verfahren erfordert eine manuelle Probenvorbereitung.

Verwendete Chemikalien:

- n-Butanol, 32 %-ige Salzsäure (HCl), 100 %-ige Essigsäure, Tetrahydrofuran, Heptafluorobuttersäure (HFBA) (Firma Merck Co., Darmstadt)
- CF-1 Cellulose (Firma Sigma Co. Deisenhofen)
- Isodesmosin; interner Standard (Firma ICN Biochemicals, Eschwege)

Herstellung der Puffer:

1. Waschlösung oder mobile Phase:

Aqua dest., Essigsäure und Butanol im Volumenverhältnis 1/1/4

2. Reaktionspuffer:

Essigsäure und Butanol in Volumenverhältnis 1/4

3. Cellulose-Slurry:

Zugabe von 50 ml mobiler Phase zu 5 g CF-1 Cellulose mit anschließendem Aufschlemmen des Gemischs mit dem Magnetrührer (IKA).

Nach dem Auftauen und kurzem Vortexen wurden jeweils 1 ml der Synovialflüssigkeitsproben in braune Hydrolysegläser überführt, mit 32 %-iger Salzsäure im Verhältnis 1:1 versetzt und luftdicht verschlossen. Im Anschluss erfolgte eine Hydrolyse für 18 Stunden bei 116 °C im Metallblockthermostaten (Techne). Mit Hilfe der manuellen Partitionschromatographie an einer CF-1-Cellulosesäule wurden die Hydrolysate gereinigt. Dazu wurden zunächst 5 ml Pipettenspitzen (Gilson) mit Haushaltswatte bestückt und mit der gut gemischten Cellulose-Slurry gefüllt. Es folgte eine Waschung der Säulen mit 5 ml mobiler Phase.

Die hydrolysierten Proben wurden mit 0,5 ml mobiler Phase, 100 µl Isodesmosin und 3 ml Reaktionspuffer im Hydrolyseglas gut gemischt und quantitativ auf die Säulen überführt; anschließend zweimal mit 8 ml mobiler Phase gewaschen und 10 min unter Vakuum getrocknet. Die Trocknung und alle folgenden Schritte wurden auf einer Vakuumstation (Elu-Vac) durchgeführt. Es schloss sich eine Waschung der Säule mit 0,5 ml Tetrahydrofuran und eine erneute Vakuumtrocknung für 10 min an. Im nächsten Schritt folgte die Eluierung der Probe mit 0,5 ml Elutionslösung. Das Eluat wurde in einem Falcon-Röhrchen auf einem 1:1 Gestell aufgefangen. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 1000 U/min. Im letzten Schritt wurden die Substanzen in 300 µl Vials (Chromacol) pipettiert.

Für die HPLC kamen folgende Geräte zum Einsatz: Autosampler AS 4000, Fluoreszenzdetektor F 1080, Pumpe L 6220, UV/VIS Detektor L 4250 und Computer Interface D 6000 (Merck Co., Darmstadt).

Die mobile Phase bestand aus Puffer A (1 % Heptafluorobuttersäure (HFBA) in Wasser) und Puffer B (75 % Acetonitril und 25 % Puffer A).

Das Injektionsvolumen betrug 200 µl. Die Trennung der beiden Crosslinks Pyd und DPyd erfolgte an einer LiChrospher-RP-18-Säule durch Ionenpaarchromatographie. Dies hat den Vorteil, dass stark geladene Ionen mittels eines Ionenpaarreagens (HFBA) besser getrennt werden können. Durch die Eigenfluoreszenz der beiden Crosslinks ist eine Bestimmung mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors möglich ohne

vorherige Derivatisierung (Extinktion 295 nm, Emission 395 nm). Die Messung des internen Standards Isodesmosin erfolgte bei 280 nm mit dem UV/VIS Detektor. Die Nachweisgrenze für Pyd betrug 25 fmol und für DPyd 56 fmol. Zur Qualitätssicherung wurden bei jeder HPLC-Serie zwei gepoolte Proben mitgeführt. Die Angabe der Pyd- und DPyd-Spiegel erfolgte in nmol/l.

4.3.2 COMP

Die Bestimmung der COMP-Spiegel erfolgte mittels Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) der Firma AnaMar Medical AB, Uppsala, Schweden.

Der COMP-ELISA ist ein Festphase-Enzym-Immunoassay, basierend auf der Direkt-Sandwich-Technik, bei der zwei monoklonale AK gegen verschiedene Antigen-Determinanten des COMP-Moleküls gerichtet sind. Während der Inkubation reagiert COMP aus der Synovialflüssigkeitsprobe mit Peroxidase-konjugierten Anti-COMP-AK einerseits und mit Anti-COMP-AK, die an die Oberfläche der Mikrotiterplattenaktivität gebunden sind, andererseits. Mittels einer einfachen Waschstufe wurden ungebundene, Enzym-markierte AK entfernt. Der Nachweis des gebundenen Konjugates erfolgte durch eine Reaktion mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin. Durch Zugabe einer säurehaltigen Lösung wurde die Reaktion gestoppt, das gefärbte Endgemisch der Reaktion spektrophotometrisch gemessen und ausgewertet. Der COMP-Spiegel wurde in U/l angegeben.

4.4 Bestimmung der AGEs Pentosidin und CML

Bei den AGEs wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und der Mittelwert berechnet.

4.4.1 Pentosidin

Die Bestimmung des Totalpentosidins erfolgte in Anlehnung an die von Miyata beschriebene HPLC-Methode (Miyata et al. 1996c, Miyata et al. 1998).

Die Proben wurden nach vollständigem Auftauen kurz gevortext und dann 3 min bei 8000 U/min (4°C) zentrifugiert. Es wurden je 50 µl Synovialflüssigkeit und 50 µl 32 %-ige HCl (10 normal) in ein Reaktionsgefäß gegeben, maschinell geschüttelt und 3 min

bei 10000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden die Probengefäße in ein Reaktionsgefäß überführt, welches mit einem Ventilverschluß versehen war. In dieses waren zuvor 100 µl Aqua dest. und 100 µl HCl (10 normal) gegeben wurden.

Es folgte ein dreimaliger Stickstoffaustausch, indem durch das Ventil die Gase abgesaugt und Stickstoff eingeleitet wurde. Am Ende verblieb die Stickstoffatmosphäre im Reaktionsgefäß. Dieser Schritt verhinderte eine weitere AGE-Bildung durch Oxidation.

Über Nacht wurden die Proben für 16 Stunden bei 110 °C im Wärmeschrank hydrolysiert und das Pentosidin in seine protein- bzw. peptidfreie Form überführt.

Nach der Neutralisierung des Hydrolysats mit 200 µl Phosphat-Puffer (0,5 molar, pH = 7,4) und 100 µl Natronlauge (5 normal) folgte ein erneutes Schütteln. Zur Reinigung durch Ultrafiltration wurde der Ansatz in Millipore-Filter überführt (Porengröße 0,45 µm) und 3 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Nach der Verdünnung der Proben mit PBS-Puffer (100 µl Probe und 900 µl PBS) wurde der Pentosidingehalt nach der Gradiententrennung an einer LiChropher RP-18 Säule (Merck, Darmstadt) mittels HPLC bestimmt.

Unter Ausnutzung der fluoreszierenden Eigenschaften des Pentosidins erfolgte die Messung mit dem Fluoreszenzdetektor (Extinktion 335 nm, Emission 385 nm).

Zur Kalibrierung der HPLC-Methode stand eine Standardlösung mit definierter Konzentration an synthetisch gewonnenem Pentosidin zur Verfügung.

Die HPLC-Anlage (Merck-Hitachi, Darmstadt) bestand aus Autosampler L 7200, Fluoreszenzdetektor L 7480, Gradientenpumpe L 7100, Computerinterface D 7000.

Als mobile Phase wurde 0,1 %-ige Trifluoressigsäure (Phase A) und Acetonitril (Phase B) gewählt. Das Zeitprogramm setzte sich aus den in Tabelle 9 aufgeführten Gradienten zusammen. Das Injektionsvolumen betrug 50 µl. Die Angabe der Werte erfolgte in nmol/l. Die volumenbezogenen Werte wurden auch auf die Proteinmasse der Synovialflüssigkeit bezogen und in pmol/mg angegeben.

Tabelle 9: Zeitprogramm der HPLC-Messung zur Pentosidinbestimmung mit Angabe der Gradienten

Schritt	Zeit (min)	Phase A (%)	Phase B (%)
Trennung	0	100	0
	16	90	10
Reinigung	18	90	10
	22	0	100
	26	0	100
Äquilibration	30	100	0
	37	100	0

4.4.2 N- ϵ -Carboxymethyl-Lysin (CML)

Die Bestimmung der CML-Konzentration erfolgte mit Hilfe eines kompetitiven ELISA-Systems (Roche-Diagnostics GmbH, Penzberg).

Folgende Reagenzien (Roche, Biochemica) wurden verwendet:

- Waschpuffer: 1 Teil Waschmedium mit 9 Teilen destilliertem Wasser verdünnt
- Proteinkinase K-Lösung: 5,5 mg Proteinkinase K und 5 ml Waschpuffer
- PMSF-Stocklösung: 1 Teil PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) mit 49 Teilen Waschpuffer verdünnt
- Inkubationslösung: gebrauchsfertige Lösung
- Bi-BSA-AGE-Lösung: 70 μ l gebrauchsfertiges BSA-AGE und 14 ml Inkubationspuffer
- Standards und Kontrollen: gebrauchsfertige Lösung mit aufgedruckter Konzentration
- Konjugat: MAK-Lösung: 10 μ l MAK-CML-IgG-POD (140 U/ml, horse-radish-peroxidase-konjugierter monoklonaler Maus-anti-CML-Antikörper) und 15 ml Inkubationspuffer

- Substratlösung: gebrauchsfertige ABTS-Natriumperborat-Lösung (ABTS: 2,2-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)] diammonium salt)
- Mikrotiterplatte: mit Streptavidin beladen, gebrauchsfertig

Die Proben wurden aufgetaut, kurz gevortext und zentrifugiert (8 °C, 8000 U/min).

Um ein höheres Signal zu erhalten, erfolgte eine Probenvorbereitung mit Proteinkinase K und späterer Inhibition mit PMSF-Stocklösung. Es wurden 10 µl der Synovialflüssigkeit mit 100 µl Proteinkinase K-Lösung versetzt und 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit und Zugabe von 100 µl PMSF als Stocklösung erfolgte die erneute Inkubation dieses Ansatzes für 30 min.

Danach konnten die so behandelten Proben zum ELISA eingesetzt werden.

Die Mikrotiterplatten wurden mit 100 µl Bi-BSA-AGE (biotinyliertes glyciertes BSA) pro Well beladen und bei Raumtemperatur unter Schütteln 1 Stunde inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer und gründlichem Ausklopfen der Platte erfolgte die Zugabe von 50 µl Probe, Standardlösung bzw. Kontrolle in die Vertiefungen. Sofort im Anschluss wurden jeweils 50 µl Konjugat (MAK-Lösung) in die Wells pipettiert und es folgte die einstündige Inkubation unter Schütteln bei Raumtemperatur.

Nach erneutem dreimaligen Waschen mit Waschpuffer wurde der Ansatz mit 100 µl Substratlösung/well versetzt und wiederum einer 30-minütigen Inkubation unter Schütteln bei Raumtemperatur unterzogen. Abschließend erfolgte die Extinktionsmessung bei 405 nm. Mit Hilfe der Standardlösungen mit bekannten Konzentrationen konnte die CML-Konzentration in der Probe ermittelt werden.

Die Nachweisgrenze des Assays betrug etwa 5 ng CML/ml. Es wurde darauf geachtet, dass die Extinktion des 0-Standarts nach der Inkubation mindestens 1500 betrug.

Der Test hatte eine Intraassay-Variation von < 5 % und eine Interassay-Variation von < 7 %. Die Angabe der volumenbezogenen Werte erfolgte in nmol/l. Die Werte bezogen auf das Protein der Synovialflüssigkeit wurden in pmol/mg angegeben.

4.5 Bestimmung des Gesamtproteins

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Synovialflüssigkeit erfolgte im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Die Angabe erfolgte in g/l und diente dazu, die volumenbezogenen AGE-Werte auf die Proteinmenge zu beziehen. Diese Analyse kann notwendig sein, um eine Vergleichbarkeit der Werte zu erhalten, da das Ausmaß der AGE-Entstehung proteinabhängig ist (Nawroth et al. 1999).

4.6 Auswertung und Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms SPSS für Windows (Version 13.0). Zur grafischen Darstellung der Ergebnisse kamen die üblichen Verfahren der beschreibenden Statistik zum Einsatz.

Die Werte wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf das Vorliegen von Normalverteilung geprüft. Um bestehende Zusammenhänge zwischen den Parametern zu erkennen, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman-Rho berechnet. Außerdem kam der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz, um Verteilungsunterschiede zu ermitteln.

5 Ergebnisse

5.1 Messergebnisse der natürlichen Crosslinks und des COMP

5.1.1 Deskriptive Statistik

In der folgenden Tabelle 10 sind jeweils Mittelwert, Standardabweichung und Median der gemessenen Crosslinks Pyd und DPyd, des Pyd/DPyd-Quotienten und des COMP dargestellt. Die verschiedenen Patientenzahlen ergeben sich aus der Tatsache, dass die Menge an Synovialflüssigkeit nicht in jedem Fall ausreichend war, um alle Analysen durchzuführen.

Tabelle 10: Mittelwert, Standardabweichung, Median und Patientenzahl (n) der natürlichen Crosslinks Pyridinolin (Pyd), Desoxypyridinolin (DPyd), des Pyd/DPyd-Quotienten und des COMP

	n	Mittelwert	Standardabweichung	Median
Pyd (nmol/l)	47	28,43	54,35	10,10
DPyd (nmol/l)	47	5,77	6,68	3,14
Pyd/DPyd	47	9,05	12,85	5,62
COMP (U/l)	51	59,26	35,88	49,25

Die Abbildungen 4 bis 7 zeigen die Boxplots der eben genannten Werte und lassen eine schiefe Verteilung erkennen. Bei Pyridinolin bzw. dem Pyd/DPyd-Quotienten fallen außerdem die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Werte auf, die Ausreißer darstellen. In den folgenden Analysen wurden diese Werte nicht mit berücksichtigt.

5.1.2 Test auf Normalverteilung

Zur Überprüfung der Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 11 aufgelistet. Die Signifikanzwerte sprechen sowohl bei den zwei Crosslinks Pyd und DPyd als auch bei dem Pyd/DPyd-Quotienten und bei COMP gegen eine Normalverteilung.

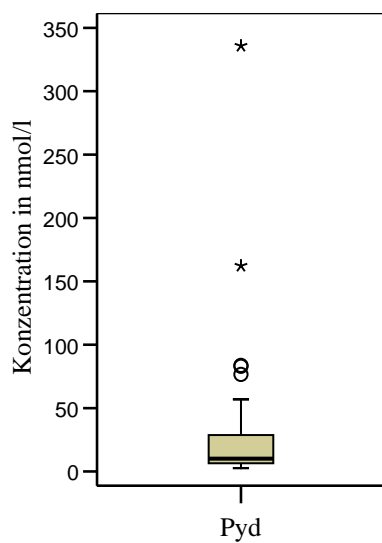


Abbildung 4: Boxplotdarstellung der Pyridinolinwerte (Pyd)

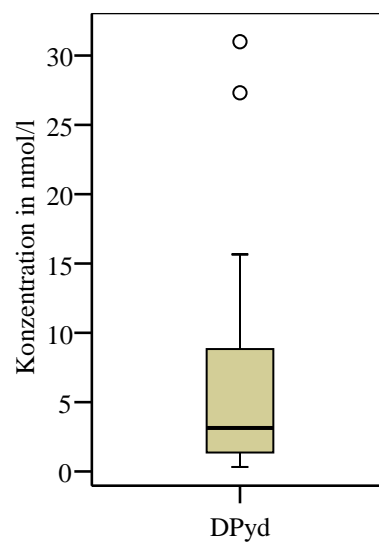


Abbildung 5: Boxplotdarstellung der Desoxypyridinolinwerte (DPyd)

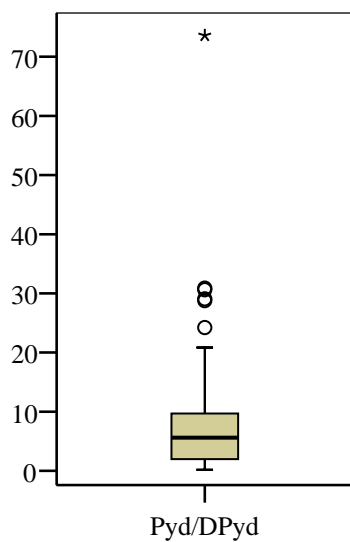


Abbildung 6: Boxplotdarstellung des Pyridinolin/Desoxypyridinolin-Quotienten (Pyd/DPyd)

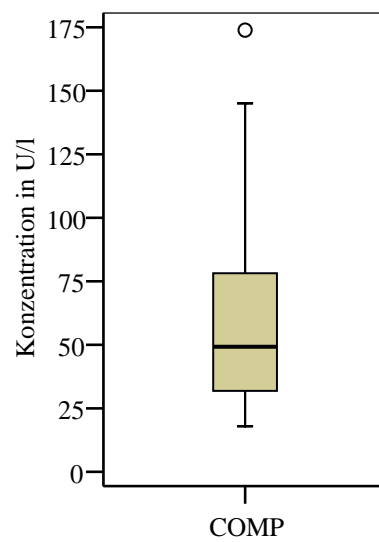


Abbildung 7: Boxplotdarstellung der COMP-Werte

Tabelle 11: Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung der Messwerte Pyd, DPyd, COMP und des Pyd/DPyd-Quotienten (n = Stichprobenumfang)

Crosslinks	Statistik	n	Signifikanz
Pyd	0,251	45	0,000
DPyd	0,215	47	0,000
Pyd/DPyd	0,209	46	0,000
COMP	0,127	51	0,039

5.1.3 Korrelationsanalyse der Abbaumarker

Für die Korrelationsanalyse kann nur der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho berechnet werden (Tabelle 12), da der Korrelationskoeffizient nach Pearson normalverteilte Werte voraussetzt. Somit wird nur der monotone, aber nicht der lineare Zusammenhang geprüft.

Tabelle 12: Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho (r) und Signifikanz (p) der Korrelationsanalysen der natürlichen Crosslinks und des COMP; die mit Stern (*) gekennzeichneten Werte sind signifikant (n = Stichprobenumfang)

korrelierte Werte	n	r	p
Pyd – DPyd	45	0,105	0,494
Pyd – COMP	45	0,459*	0,001
DPyd – COMP	47	-0,105	0,481
Pyd/DPyd – COMP	46	0,451*	0,002

Ein signifikanter positiver Zusammenhang ($r = 0,459$; $p = 0,001$) ergibt sich zwischen Pyd und COMP (Abbildung 8) sowie zwischen dem Pyd/DPyd-Quotienten und COMP ($r = 0,451$; $p = 0,002$) (Abbildung 9).

Die Analyse der Pyd – DPyd Korrelation ist zwar schwach positiv ($r = 0,105$), erreicht aber keine Signifikanz ($p = 0,494$). Eine schwach negative, nicht signifikante Korrelation ergibt sich zwischen DPyd und COMP ($r = -0,105$; $p = 0,481$).

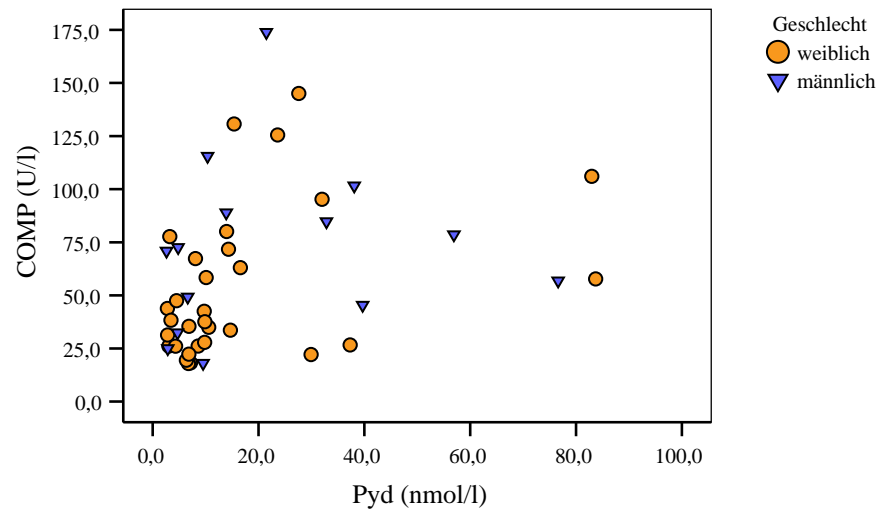


Abbildung 8: Korrelation von Pyd und COMP, dargestellt im Streudiagramm getrennt nach Geschlecht

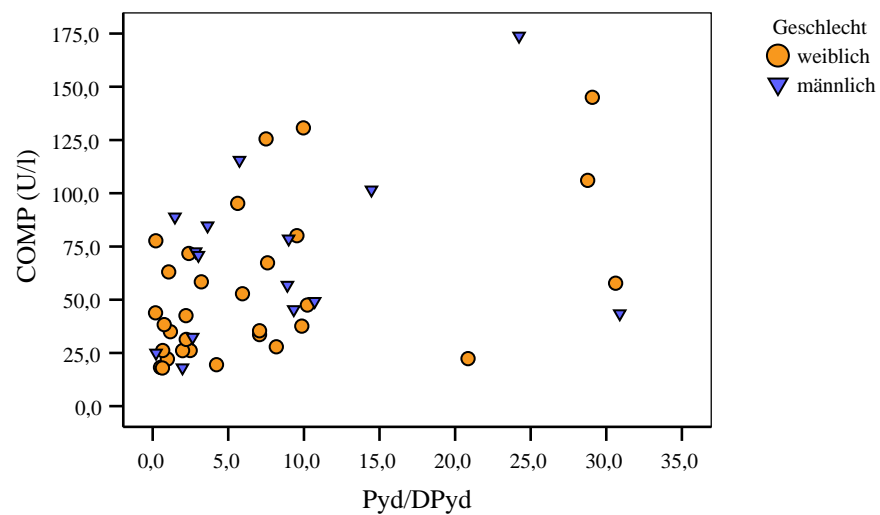


Abbildung 9: Korrelation zwischen dem Pyd/DPyd-Quotienten und COMP, dargestellt im Streudiagramm getrennt nach Geschlecht

5.2 Messergebnisse der AGEs

5.2.1 Deskriptive Statistik

Die in Tabelle 13 aufgeführten Werte der AGEs lassen erkennen, dass vor allem bei dem Pentosidinspiegel an sich und dem Spiegel bezogen auf den Proteingehalt der Synovialflüssigkeit Median und Mittelwert weit auseinander liegen.

Tabelle 13: Stichprobenumfang (n), Mittelwert, Standardabweichung und Median der gemessenen AGE-Spiegel Pentosidin und CML (Pentosidin; CML) sowie bezogen auf den Eiweißgehalt der Synovialflüssigkeit (Pentosidin/Protein; CML/Protein)

	n	Mittelwert	Standardabweichung	Median
Pentosidin (nmol/l)	51	126,85	16,38	80,49
CML (nmol/l)	50	345,84	21,94	318,58
Pentosidin/Protein (pmol/mg)	51	3,31	0,43	2,13
CML/Protein (pmol/mg)	50	9,38	0,73	7,96

Aus den Boxplotdarstellungen der Pentosidinwerte Abbildung 10 und 12 kann zunächst vermutet werden, dass die Werte nicht aus einer normalverteilten Grundgesamtheit entstammen, da eine gewisse Verteilungsschiefe erkennbar ist. Bei dem Pentosidinspiegel bezogen auf den Eiweißgehalt fallen in der Abbildung 12 die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Werte auf, die Ausreißer darstellen und in der folgenden Auswertung nicht mit berücksichtigt werden.

Aufgrund der relativ symmetrischen Boxplotdarstellungen der CML-Spiegel (Abbildung 11 und 13) kann für diese Parameter eine Normalverteilung vermutet werden.

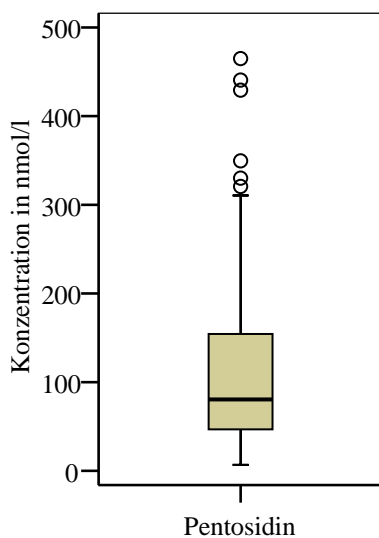


Abbildung 10: Boxplotdarstellung der Pentosidinwerte

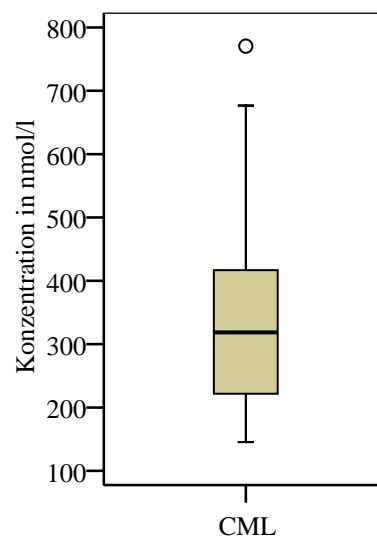


Abbildung 11: Boxplotdarstellung der CML-Werte

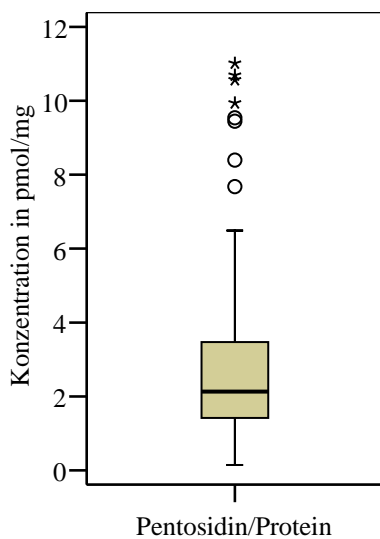


Abbildung 12: Boxplotdarstellung der Pentosidinwerte bezogen auf den Proteingehalt

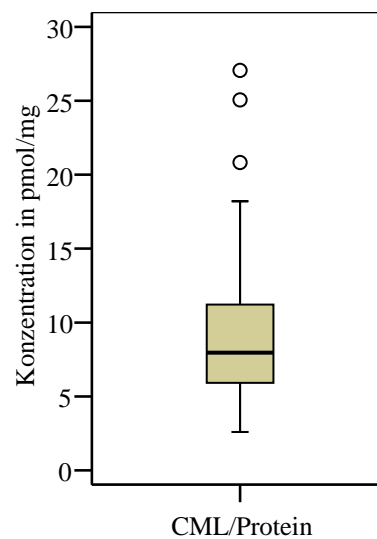


Abbildung 13: Boxplotdarstellung der CML-Werte bezogen auf den Proteingehalt

5.2.2 Test auf Normalverteilung

Zur Überprüfung der Normalverteilung wurde auch hier der Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse dargelegt. Die Signifikanzwerte bestätigen die Vermutung, dass Pentosidin und Pentosidin bezogen auf den Proteingehalt (Pentosidin/Protein) keiner Normalverteilung unterliegen, ebenso der CML-Spiegel bezogen auf den Eiweißgehalt der Synovialflüssigkeit. Der CML-Spiegel an sich ist jedoch normalverteilt.

Tabelle 14: Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung der Messwerte Pentosidin, CML, Pentosidin/Protein und CML/Protein (n = Stichprobenumfang)

AGEs	Statistik	n	Signifikanz
Pentosidin	0,220	51	0,000
CML	0,100	50	0,200
Pentosidin/Protein	0,223	47	0,000
CML/Protein	0,163	50	0,002

5.2.3 Korrelationsanalyse der AGEs

Für die Korrelationsanalyse der AGEs wird ebenfalls der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho verwendet (Tabelle 15), da lediglich die CML-Werte normalverteilt sind. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson verlangt eine Normalverteilung beider Korrelationspartner.

Die Korrelation zwischen Pentosidin und CML ist zwar schwach positiv ($r = 0,212$), erreicht aber keine Signifikanz ($p = 0,140$), ebenso die Korrelation von Pentosidin mit dem proteinbezogenen CML (CML/Protein) ($r = 0,043$, $p = 0,769$). Ein schwacher, monoton steigender, nicht signifikanter Zusammenhang ergibt sich mit $r = 0,230$ und $p = 0,125$ auch bei CML und dem eiweißbezogenen Pentosidin (Pentosidin/Protein) sowie mit $r = 0,215$ und $p = 0,151$ bei den proteinbezogenen AGEs untereinander.

Tabelle 15: Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho (r) und Signifikanz (p) der AGEs (n = Stichprobenumfang)

korrelierte Werte	n	r	p
Pentosidin – CML	50	0,212	0,140
Pentosidin – CML/Protein	50	0,043	0,769
CML – Pentosidin/Protein	46	0,230	0,125
CML/Protein – Pentosidin/Protein	46	0,215	0,151

5.3 Zusammenhang zwischen den Abbaumarkern und den AGEs

Die Zusammenhangsanalyse wurde mit dem Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho durchgeführt, da die Werte, mit Ausnahme von CML, keiner Normalverteilung unterliegen (vgl. 5.1.2 und 5.2.2). Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt.

Ein monoton steigender Zusammenhang ergibt sich mit $r = 0,298$ zwischen Pentosidin und Pyridinolin (Abbildung 14). Diese Korrelation ist mit $p = 0,047$ als signifikant zu werten.

Auch die positive Korrelation ($r = 0,361$) zwischen Pentosidin und Desoxypyridinolin erreicht mit $p = 0,013$ Signifikanz (Abbildung 15).

Die Beziehung Pentosidin – Pyd/DPyd-Quotient ist schwach negativ, jedoch nicht signifikant ($r = -0,104$; $p = 0,492$). Die Pentosidin – COMP Analyse ist mit $r = 0,065$ und $p = 0,652$ nicht bedeutsam, ebenso die Untersuchung CML – COMP ($r = 0,027$; $p = 0,853$). Die Korrelation CML und Pyridinolin ist mit $r = -0,252$ schwach negativ aber ohne Signifikanz ($p = 0,099$). Der schwach monoton steigende Zusammenhang ($r = 0,215$) zwischen CML und DPyd erreicht kein signifikantes Niveau ($p = 0,150$).

Tabelle 16: Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho (r) und Signifikanz (p) der Zusammenhangsanalyse der Abbaumarker (Pyd, DPyd, Pyd/DPyd-Quotient, COMP) und den AGEs (Pentosidin, CML, Pentosidin/Protein, CML/Protein); die mit Stern (*) gekennzeichneten Werte sind signifikant (n = Stichprobenumfang)

	Pyd	DPyd	Pyd/DPyd	COMP
Pentosidin	n = 45 r = 0,298 * p = 0,047	n = 47 r = 0,361 * p = 0,013	n = 46 r = -0,104 p = 0,492	n = 51 r = 0,065 p = 0,652
CML	n = 44 r = -0,252 p = 0,099	n = 46 r = 0,215 p = 0,150	n = 45 r = -0,308 * p = 0,040	n = 50 r = 0,027 p = 0,853
Pentosidin/Protein	n = 41 r = 0,340 * p = 0,030	n = 43 r = 0,205 p = 0,188	n = 42 r = 0,090 p = 0,570	n = 47 r = 0,212 p = 0,152
CML/Protein	n = 44 r = -0,220 p = 0,152	n = 46 r = 0,046 p = 0,761	n = 45 r = -0,206 p = 0,174	n = 50 r = 0,170 p = 0,239

Im Gegensatz dazu lies sich ein signifikanter ($p = 0,040$), negativer Korrelationskoeffizient von $r = -0,308$ bei der Analyse von CML und dem Pyd/DPyd-Quotienten nachweisen (Abbildung 16).

Ebenfalls signifikant ($p = 0,030$) ist die Korrelation: proteinbezogenes Pentosidin und Pyridinolin. Hier ergibt sich mit $r = 0,340$ ein positiver Zusammenhang (Abbildung 17). Eine schwach monoton steigende Beziehung besteht auch bei Pentosidin/Protein und Desoxypyridinolin ($r = 0,205$) sowie bei Pentosidin/Protein und COMP ($r = 0,212$), in beiden Fällen erreicht p nicht das Signifikanzniveau ($p = 0,188$ bzw. $p = 0,152$).

Ohne Bedeutung ist mit $r = 0,090$ und $p = 0,570$ die Zusammenhangsanalyse von Pentosidin/Protein und dem Pyd/DPyd-Quotienten. Auch bei der Korrelation von CML/Protein und Desoxypyridinolin verhält es sich mit $r = 0,046$ und $p = 0,761$ ähnlich.

Sowohl die Beziehung zwischen dem proteinbezogenen CML und Pyridinolin ist schwach negativ ($r = -0,220$) als auch die zwischen dem proteinbezogenen CML und

dem Pyd/DPyd-Quotienten ($r = -0,206$). In beiden Fällen erreichen die Korrelationen allerdings keine signifikanten Werte ($p = 0,152$ bzw. $p = 0,174$).

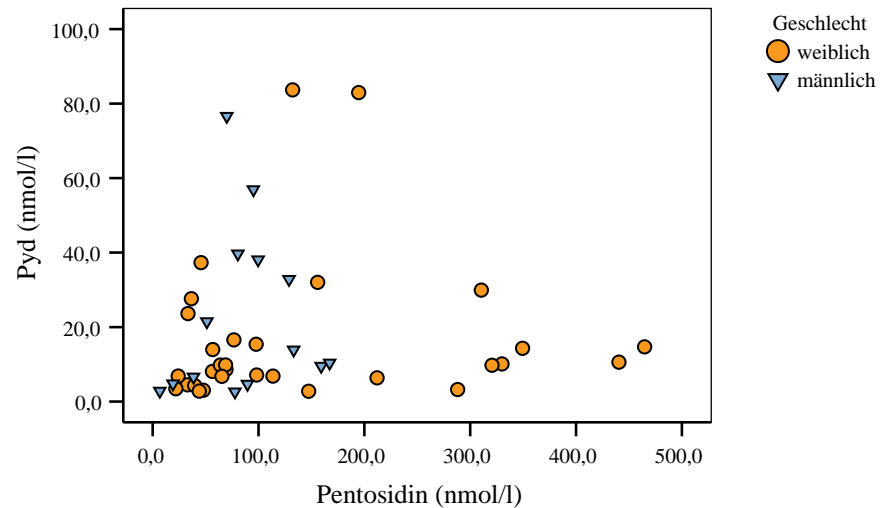


Abbildung 14: Korrelation zwischen Pentosidin und Pyridinolin (Pyd), dargestellt im Streudiagramm getrennt nach Geschlecht

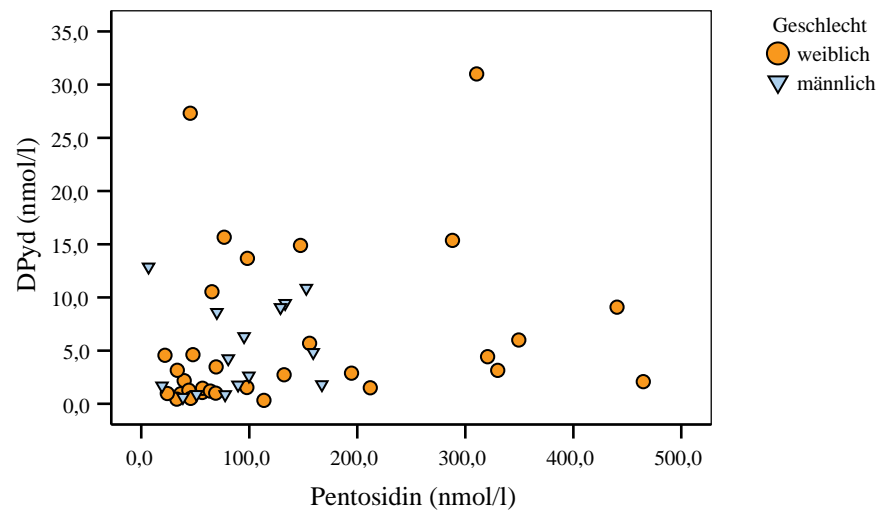


Abbildung 15: Korrelation zwischen Pentosidin und Desoxypyridinolin (DPyd), dargestellt im Streudiagramm getrennt nach Geschlecht

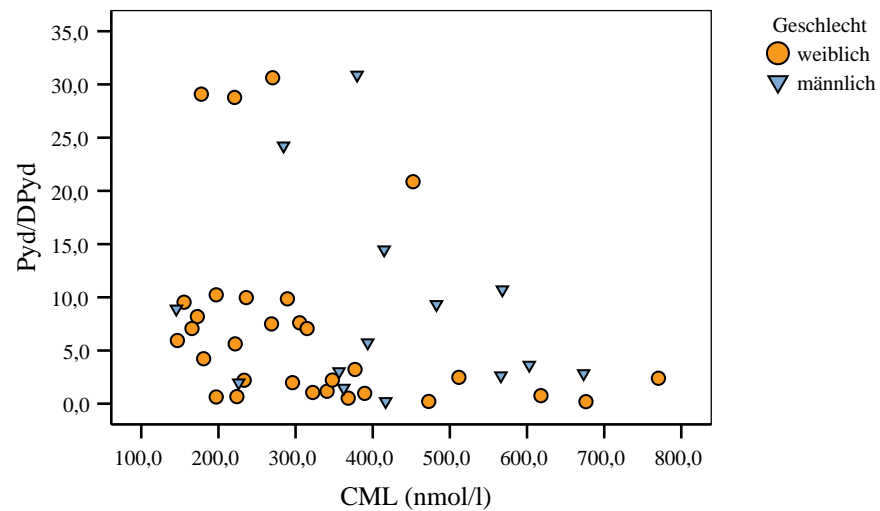


Abbildung 16: Korrelation zwischen CML und dem Pyd/DPyd-Quotient (Pyd/DPyd), dargestellt im Streudiagramm getrennt nach Geschlecht

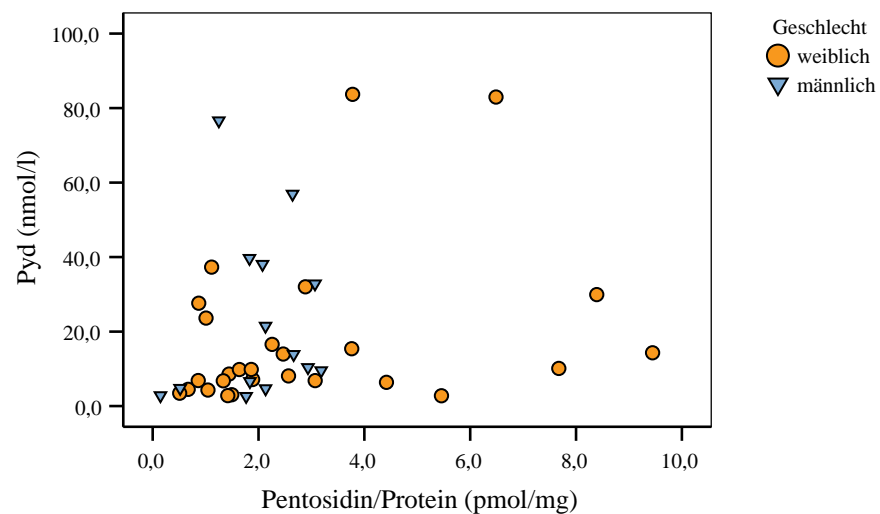


Abbildung 17: Korrelation zwischen proteinbezogenem Pentosidin (Pentosidin/Protein) und Pyridinolin (Pyd), dargestellt im Streudiagramm getrennt nach Geschlecht

Die Beziehung CML/Protein und COMP ist mit $r = 0,170$ schwach positiv, jedoch ergibt sich auch hier ein p-Wert, der gegen eine Signifikanz spricht ($p = 0,239$).

In den vorausgegangenen Korrelationsanalysen wurden die Ausreißerwerte, wie unter 5.1.1 und 5.2.1 beschrieben, nicht mit in die Analyse einbezogen. Würde man die Werte in die statistische Berechnung mit einfließen lassen, käme es zu Änderungen.

Die Korrelation Pentosidin – Pyridinolin ($r = 0,272$; $n = 47$) erreicht mit $p = 0,066$ keine Signifikanz, ebenso mit $p = 0,145$ die Zusammenhangsanalyse proteinbezogenes Pentosidin – Pyridinolin ($r = 0,216$; $n = 47$).

Die negative Beziehung von CML und dem Pyd/DPyd-Quotient wäre mit $r = -0,333$ etwas stärker und weiterhin signifikant ($p = 0,24$; $n = 46$).

An der Korrelation Pentosidin – Desoxypyridinolin würde sich nichts ändern ($r = 0,361$; $p = 0,013$; $n = 47$).

5.4 Altersabhängigkeit der Werte

5.4.1 Altersabhängigkeit der natürlichen Crosslinks und des COMP

In dem Kolmogorov-Smirnov-Test ergab sich für das Alter bei Probeentnahme eine Normalverteilung (vgl. Tabelle 17). Die Verteilung der Crosslinks ist unter 5.1.2 beschrieben.

Tabelle 17: Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung für das Alter bei Probeentnahme (n = Stichprobenumfang)

	Statistik	n	Signifikanz
Alter	0,088	51	0,200

Um zu testen, ob es eine Beziehung zwischen dem Alter der Probanden und den Abbaumarkern gibt, wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho berechnet. Wie aus der Tabelle 18 ersichtlich wird, korreliert lediglich Pyridinolin (Pyd) auf einem signifikantem Niveau ($p = 0,005$) mit $r = 0,409$ positiv mit dem Alter. Die Korrelation ist in Abbildung 18 grafisch dargestellt.

Die übrigen Abbaumarker stehen zwar in schwach positivem Zusammenhang mit dem Alter, ohne jedoch Signifikanz zu erlangen.

Tabelle 18: Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho (r) und Signifikanz (p) der Zusammenhangsanalyse der Abbaumarker Pyridinolin (Pyd), Desoxypyridinolin (DPyd), COMP und des Pyd/DPyd-Quotienten mit dem Alter; der mit Stern (*) gekennzeichnete Wert ist signifikant (n = Stichprobenumfang)

	Pyd	DPyd	Pyd/DPyd	COMP
Alter	n = 45 $r = 0,409^*$ $p = 0,005$	n = 47 $r = 0,158$ $p = 0,287$	n = 46 $r = 0,062$ $p = 0,682$	n = 51 $r = 0,002$ $p = 0,986$

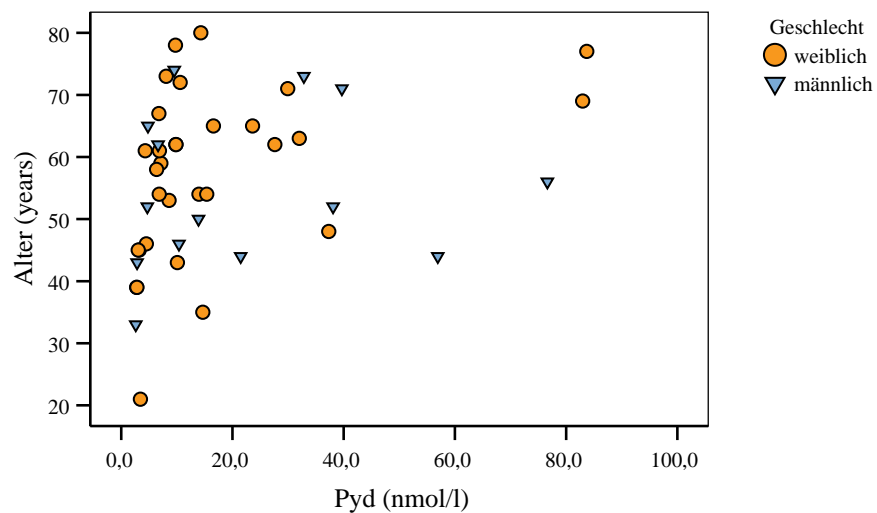


Abbildung 18: Korrelation zwischen Pyridinolin (Pyd) und dem Alter, dargestellt im Streudiagramm getrennt nach Geschlecht

5.4.2 Altersabhängigkeit der AGEs

Die Korrelation der AGEs mit dem Alter erfolgte ebenfalls über die Korrelationsanalyse nach Spearman. Für die Beziehungen zwischen Pentosidin bzw. dem proteinbezogenen Pentosidin und dem Alter ergaben sich mit $r = 0,100$ bzw. $r = 0,157$ (siehe dazu Tabelle 19) schwach positive Koeffizienten. Die p -Werte erreichten jedoch in beiden Fällen keine Signifikanz ($p = 0,484$ bzw. $p = 0,292$).

Eine schwach monoton fallende Beziehung ergab sich bei der Analyse des Alters und dem CML ($r = -0,232$). Der p -Wert von 0,106 spricht auch hier gegen einen

signifikanten Zusammenhang. Praktisch keine Korrelation ergibt sich mit $r = -0,067$ und $p = 0,645$ zwischen dem eiweißbezogenen CML und dem Alter.

Tabelle 19: Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho (r) und Signifikanz (p) der Zusammenhangsanalyse der AGEs Pentosidin, CML und der proteinbezogenen AGEs mit dem Alter

	Pentosidin	CML	Pentosidin/ Protein	CML/ Protein
Alter	n = 51 $r = 0,100$ $p = 0,484$	n = 50 $r = -0,232$ $p = 0,106$	n = 47 $r = 0,157$ $p = 0,292$	n = 50 $r = -0,067$ $p = 0,645$

5.5 Unterschiede der Ergebnisse unter den Geschlechtern

5.5.1 Deskriptive Statistik

In der Tabelle 20 sind Mittelwert, Standardabweichung und Median der einzelnen Crosslinks, des COMP und der AGEs getrennt nach Geschlecht aufgelistet, ebenso das Alter bei Probenentnahme. Auch bei der Trennung nach Geschlecht fällt auf, dass Mittelwert und Median der Werte voneinander abweichen. Die schiefe Verteilung bleibt weiterhin bestehen.

Einige Ergebnisse lassen vermuten, dass es Unterschiede der Spiegel unter den Geschlechtern gibt. Der Median des CML-Spiegels bei Frauen liegt mit 296,02 nmol/l deutlich unter dem der Männer, der 393,41 nmol/l beträgt. Eine ähnliche Konstellation ergibt sich bei dem Median der COMP-Spiegel (weiblich 43,84 U/l, männlich 63,87 U/l). Keine große Differenz erkennt man bei dem Median des eiweißbezogenen Pentosidin-Spiegels, bei den weiblichen Probanden liegt er bei 1,89 pmol/mg Protein bei den männlichen bei 2,10 pmol/mg Protein.

Tabelle 20: Stichprobenumfang (n), Mittelwert, Standardabweichung und Median der Abbaumarker, der AGEs und des Alters getrennt nach Geschlecht

		n	Mittelwert	Standard- abweichung	Median
Pyd (nmol/l)	weiblich	31	16,68	19,99	9,82
	männlich	14	22,93	22,89	12,14
DPyd (nmol/l)	weiblich	32	6,08	7,63	3,01
	männlich	15	5,10	4,12	4,25
Pyd/DPyd	weiblich	31	7,19	8,65	4,22
	männlich	15	8,60	8,78	5,74
COMP (U/l)	weiblich	35	54,71	33,91	43,84
	männlich	16	69,22	39,10	63,87
Pentosidin (nmol/l)	weiblich	35	143,72	134,76	76,74
	männlich	16	89,96	48,54	85,03
CML (nmol/l)	weiblich	35	321,72	149,71	296,02
	männlich	15	402,11	157,96	393,41
Pentosidin/Protein (pmol/mg)	weiblich	31	3,05	2,66	1,89
	männlich	16	2,02	0,85	2,10
CML/Protein (pmol/mg)	weiblich	35	9,03	4,70	7,79
	männlich	15	10,19	6,29	8,64
Alter (Jahre)	weiblich	35	56,94	15,02	59,00
	männlich	16	53,44	14,25	52,00

Um zu überprüfen, ob es bei den Frauen und Männern statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Synovialflüssigkeitsspiegel der einzelnen Substanzen gibt, kam der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung. Die Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 21: Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests auf Verteilungsunterschiede der Abbaumarker- und AGE-Spiegel zwischen beiden Geschlechtern

	mittlerer Rang		asymptotische Signifikanz
	weiblich	männlich	
Pyd	22,16	24,86	0,524
DPyd	23,72	24,60	0,837
Pyd/DPyd	22,10	26,40	0,308
COMP	24,00	30,36	0,155
Pentosidin	26,49	24,94	0,730
CML	23,03	31,27	0,067
Pentosidin/Protein	24,58	22,88	0,686
CML/Protein	24,83	27,07	0,619

Bei den Crosslinks Pyd, DPyd und dem Pyd/DPyd-Quotient liegen die mittleren Ränge nahe beieinander und der Test auf geschlechtsspezifische Unterschiede erreicht keine Signifikanz. Bei COMP ist der Test, entgegen den Erwartungen, mit $p = 0,155$ ebenso nicht signifikant.

Bei den AGEs stellt sich ein ähnliches Bild dar. Gegenüber den CML-Werten kann der Eindruck, der sich aus Tabelle 20 ergibt, nicht bestätigt werden. Die Hypothese, dass keine geschlechtsspezifischen Unterschiede vorliegen, wird nicht abgelehnt ($p = 0,067$). Diese Irrtumswahrscheinlichkeit liegt allerdings nur knapp über der 5 %-Grenze.

Für Pentosidin, proteinbezogenes Pentosidin und proteinbezogenes CML zeigen sich mittlere Ränge, die keine gravierenden Unterschiede zwischen Frauen und Männern aufweisen. Die asymptotische Signifikanz liegt mit $p = 0,730$ bei Pentosidin, $p = 0,686$ bei Pentosidin/Protein und $p = 0,619$ bei CML/Protein deutlich über der Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %.

Zusammenfassend ist demnach zu sagen, dass es vermutlich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in den Synovialflüssigkeitsspiegeln der verschiedenen Crosslinks und AGEs gibt.

5.5.2 Normalverteilung

In Tabelle 22 und 23 sind die Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung separat für die weibliche und männliche Untersuchungsgruppe dargestellt. Wie aus Tabelle 22 zu entnehmen ist, unterliegt lediglich das Alter der Frauen einer Normalverteilung ($p = 0,200$). Die einzelnen Crosslinks und AGEs sind nicht normalverteilt.

Tabelle 22: Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung der weiblichen Probanden (n = Stichprobenumfang)

	Statistik	n	Signifikanz
Pyd	0,276	31	0,000
DPyd	0,264	32	0,000
Pyd/DPyd	0,233	31	0,000
COMP	0,166	35	0,016
Pentosidin	0,232	35	0,000
CML	0,127	35	0,164
Pentosidin/Protein	0,191	31	0,006
CML/Protein	0,153	35	0,038
Alter	0,099	35	0,200

Bei den Männern liegt ebenso eine Normalverteilung beim Alter vor. Es ergeben sich auch Signifikanzen von $p = 0,200$ bei dem COMP-Spiegel, dem Pentosidin-Spiegel, dem CML-Spiegel und dem Spiegel des proteinbezogenen CML (siehe Tabelle 23), sodass auch für diese Werte eine Normalverteilung angenommen werden kann.

Da jedoch bei den Frauen keine Normalverteilung zu Grunde gelegt werden kann, kommen bei der Analyse der Mann-Whitney-U-Test und der Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho zur Anwendung, die keine normalverteilten Werte voraussetzen.

Tabelle 23: Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung der männlichen Probanden (n = Stichprobenumfang)

	Statistik	n	Signifikanz
Pyd	0,225	14	0,053
DPyd	0,192	15	0,140
Pyd/DPyd	0,205	15	0,089
COMP	0,124	16	0,200
Pentosidin	0,109	16	0,200
CML	0,130	15	0,200
Pentosidin/Protein	0,195	16	0,105
CML/Protein	0,171	15	0,200
Alter	0,107	16	0,200

5.5.3 Korrelationsanalyse

Die Korrelationsanalyse nach Spearman-Rho der Abbaumarker ist in Tabelle 24 getrennt nach Geschlechtern aufgeführt. Bei den Frauen erreicht der Koeffizient bei den gleichen Korrelationspaaren signifikante Werte wie bei der Gesamtdatenanalyse (siehe Tabelle 12). Es gibt einen signifikanten, monoton steigenden Zusammenhang zwischen Pyd und COMP ($r = 0,429$; $p = 0,016$) und zwischen dem Pyd/DPyd-Quotient und COMP ($r = 0,425$; $p = 0,017$). Die übrigen Korrelationen Pyd mit DPyd sowie DPyd mit COMP erreichen kein signifikantes Niveau.

Bei den Männern zeigen die Berechnungen, mit Ausnahme der Analyse Pyd – DPyd, den gleichen Trend wie bei den Frauen. Die Korrelation Pyd – COMP ist positiv ($r = 0,358$), ebenso die des Pyd/DPyd-Quotienten mit COMP ($r = 0,329$). Sie erreichen aber im Gegenteil zu der weiblichen Gruppe keine Signifikanz. Ein negativer Zusammenhang, der auch bei den Männern kein signifikantes Niveau erreicht, ergibt sich bei dem Vergleich von DPyd und COMP ($r = -0,239$; $p = 0,390$).

Tabelle 24: Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho (r) und Signifikanz (p) der Abbaumarker getrennt nach Geschlecht; die mit Stern (*) gekennzeichneten Werte sind signifikant (n = Stichprobenumfang)

korrelierte Werte	weiblich			männlich		
	n	r	p	n	r	p
Pyd – DPyd	31	-0,29	0,875	14	0,363	0,203
Pyd – COMP	31	0,429*	0,016	14	0,358	0,208
DPyd – COMP	32	-0,026	0,886	15	-0,239	0,390
Pyd/DPyd – COMP	31	0,425*	0,017	15	0,329	0,232

Die Ergebnisse der geschlechtsspezifischen Korrelationsanalyse der AGEs sind in Tabelle 25 dargelegt.

Im Vergleich zur Analyse der Gesamtdaten (siehe Tabelle 15) ergibt sich bei den Frauen zusätzlich eine monoton steigende Korrelation bei der Gegenüberstellung von Pentosidin und CML, die signifikante p-Werte erreicht ($r = 0,402$; $p = 0,017$).

Betrachtet man die Korrelationskoeffizienten der Männer, fällt auf, dass sie im Vergleich zu denen der Frauen negativ sind. Ein ganz schwacher monoton fallender Zusammenhang ergibt sich zwischen dem eiweißbezogenen Pentosidin und dem eiweißbezogenen CML ($r = -0,093$; $p = 0,742$). Etwas stärker negativ ist der Koeffizient der Analyse von Pentosidin und CML ($r = -0,175$; $p = 0,533$). In beiden Berechnungen liegt der p-Wert deutlich über der Signifikanzschwelle.

Tabelle 25: Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho (r) und Signifikanz (p) der AGEs getrennt nach Geschlecht; die mit Stern (*) gekennzeichneten Werte sind signifikant (n = Stichprobenumfang)

korrelierte Werte	weiblich			männlich		
	n	r	p	n	r	p
Pentosidin – CML	35	0,402*	0,017	15	-0,175	0,533
Pentosidin/Protein – CML/Protein	31	0,353	0,052	15	-0,093	0,742

Die Korrelation der Abbaumarker mit den AGEs wurde ebenfalls nochmals getrennt nach Geschlechtern durchgeführt. Die Ergebnisse sind für Pyd und DPyd in Tabelle 26 und für den Pyd/DPyd- Quotienten und CML in Tabelle 27 dargestellt.

In der Analyse der Gesamtdaten (siehe Tabelle 16) ergaben sich signifikante positive Korrelationen zwischen Pentosidin und Pyd sowie zwischen proteinbezogenen Pentosidin und Pyd. In der geschlechtsspezifischen Berechnung ergeben sich zwar auch positive Korrelationen dieser Werte, sie erreichen aber weder bei den Frauen noch bei den Männern einen signifikanten p-Wert.

Pentosidin korreliert bei den Gesamtdaten mit $r = 0,361$ und $p = 0,013$ signifikant positiv mit DPyd, diese Art des Zusammenhangs ($r = 0,395$; $p = 0,025$) ist auch bei der weiblichen Untersuchungsgruppe zu sehen. Außerdem ergibt sich bei den Frauen noch ein weiterer Zusammenhang, die Korrelation CML und DPyd ist mit $r = 0,374$ monoton steigend und mit $p = 0,035$ signifikant.

Die negative Korrelation des CML mit dem Pyd/DPyd-Quotienten erreicht sowohl in der Gesamtdatenanalyse ($r = -0,308$; $p = 0,040$) als auch bei den Frauen ($r = -0,481$; $p = 0,006$) einen signifikanten p-Wert.

Auch bei diesen Berechnungen fällt auf, dass die Korrelationskoeffizienten in der weiblichen Gruppe signifikant sind, bei den Männern allerdings das Signifikanzniveau nicht erreichen.

Tabelle 26: Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho (r) und Signifikanz (p) der Zusammenhangsanalysen der natürlichen Crosslinks Pyd und DPyd mit den AGEs (Pentosidin, CML, Pentosidin/Protein, CML/Protein) getrennt nach Geschlecht; die mit Stern (*) gekennzeichneten Werte sind signifikant (n = Stichprobenumfang)

	Pyd		DPyd	
	weiblich	männlich	weiblich	männlich
Pentosidin	n = 31 r = 0,262 p = 0,154	n = 14 r = 0,292 p = 0,311	n = 32 r = 0,395 * p = 0,025	n = 15 r = 0,311 p = 0,260
CML	n = 31 r = -0,230 p = 0,213	n = 13 r = 0,225 p = 0,459	n = 32 r = 0,374 * p = 0,035	n = 14 r = -0,152 p = 0,605
Pentosidin/Protein	n = 27 r = 0,321 p = 0,103	n = 14 r = 0,222 p = 0,446	n = 28 r = 0,307 p = 0,112	n = 15 r = 0,196 p = 0,483
CML/Protein	n = 31 r = -0,202 p = 0,275	n = 13 r = -0,242 p = 0,426	n = 32 r = 0,270 p = 0,135	n = 14 r = -0,477 p = 0,085

Tabelle 27: Korrelationskoeffizient nach Spearman-Rho (r) und Signifikanz (p) der Zusammenhangsanalysen des Pyd/DPyd-Quotienten und des COMP mit den AGEs (Pentosidin, CML, Pentosidin/Protein, CML/Protein) getrennt nach Geschlecht; die mit Stern (*) gekennzeichneten Werte sind signifikant (n = Stichprobenumfang)

	Pyd/DPyd		COMP	
	weiblich	männlich	weiblich	männlich
Pentosidin	n = 31 r = -0,181 p = 0,330	n = 15 r = 0,039 p = 0,889	n = 35 r = 0,020 p = 0,911	n = 16 r = 0,144 p = 0,594
CML	n = 31 r = -0,481* p = 0,006	n = 14 r = -0,077 p = 0,794	n = 35 r = -0,056 p = 0,750	n = 15 r = -0,029 p = 0,919
Pentosidin/Protein	n = 27 r = 0,018 p = 0,928	n = 15 r = -0,004 p = 0,990	n = 31 r = 0,175 p = 0,345	n = 16 r = 0,206 p = 0,444
CML/Protein	n = 31 r = -0,312 p = 0,088	n = 14 r = 0,029 p = 0,923	n = 35 r = 0,169 p = 0,332	n = 15 r = 0,114 p = 0,685

6 Diskussion

Das klinische Bild der RA ist sehr heterogen. Ein großes Problem stellt die Frühdiagnose dar. Im Mittel vergehen knapp zwei Jahre vom Auftreten erster Symptome bis zur Diagnosestellung und Einleitung einer suffizienten Therapie. Es ist notwendig, die diagnostischen Möglichkeiten zu optimieren, da ein maximaler Behandlungserfolg nur dann erzielt werden kann, wenn die Therapie zeitig im Krankheitsverlauf einsetzt.

Voraussetzung dafür ist das bessere Verständnis der Pathogenese der Erkrankung. Bei der RA sind die Erklärungsansätze der Krankheitsentstehung vielfältig. Die genaue Ätiopathogenese ist bisher aber noch unklar. Als chronisch-entzündliche Gelenkerkrankung ist die RA durch entzündliche Infiltrate, immunpathogenetische Mechanismen, synoviale Hyperplasie und letztlich durch Knorpel- und Knochendestruktion gekennzeichnet. In den letzten Jahren konzentrierte sich die Forschung auch auf biologische Markerproteine, die die aktuelle Aktivität des Knochen-Knorpel-Metabolismus erfassen können.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte Markerproteine in der Synovialflüssigkeit bei RA-Patienten näher analysiert. Zum Einen erfolgte die Bestimmung der Pyridinium-Crosslinks Pyridinolin (Pyd) und Desoxypyridinolin (DPyd) sowie des COMP als Degradationsmarker von Knorpel- und Knochengewebe. Pyridinium-Crosslinks gelten als Abbaumarker von Kollagen I bzw. II, COMP ist ein nichtkollagener Abbaumarker. Zum Anderen wurden die AGE-Proteine Pentosidin und N-ε-Carboxymethyl-Lysin (CML) untersucht. AGEs werden bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen vermehrt generiert und akkumuliert. Ihnen wird eine pathogenetische Bedeutung zugeschrieben.

Es lässt sich die Vermutung aufstellen, dass höhere AGE-Spiegel, also eine höhere Anzahl AGE-modifizierter synovialer Proteine, eine stattgehabte oder auch aktuelle Entzündungsaktivität signalisieren und/oder eine intensivere Kollagendegradation bedingen. Im Folgenden werden die Ergebnisse der gemessenen Marker vergleichend dargestellt und die Unterschiede im Hinblick auf die Bedeutung für Diagnostik und Pathogenese diskutiert.

6.1 Beziehungen zwischen Abbaumarkern und AGEs

Die Pyridinium-Crosslinks Pyd und DPyd gehören zu den spezifischsten Markern der Knochen- und Knorpelresorption (Hein et al. 1997), aber auch andere biologische Abbaumarker, wie das COMP, sind seit längerer Zeit von Interesse, um das Ausmaß der erosiven Gelenkveränderungen bei RA zu beurteilen.

Die Kollagen-Crosslinks stellen posttranslational entstandene Quervernetzungsmoleküle des Kollagens dar, die für die besondere Zugfestigkeit des Gewebes entscheidend sind. DPyd stammt weitgehend aus osteogenem Gewebe (Kollagen I), Pyd resultiert sowohl aus dem Abbau von osteogenem als auch chondralem Gewebe (hauptsächlich Kollagen II, aber auch Kollagen I).

In den letzten Jahren konnten mehrere Arbeitsgruppen bei verschiedenen Erkrankungen erhöhte Crosslinkwerte ermitteln. Dabei dienten verschiedene Medien als Untersuchungsmaterial. Neben erhöhten Crosslink-Spiegeln im Urin bei Osteoporose (Gerrits et al. 1998), dem Hyperparathyreoidismus (MacDonald et al. 1997) und dem Morbus Paget (Robins et al. 1991) konnten zahlreiche Studien auch bei entzündlich-degenerativen Prozessen eine Steigerung der Abbaumarker zeigen. Nachfolgend werden stellvertretend einige dieser Studien aufgeführt.

1994 wiesen Astbury et al. signifikant höhere Spiegel im Urin bei Patienten mit schwerer RA im Vergleich zu milderen Verlaufsformen nach (Astbury et al. 1994).

Furumitsu et al. konnten für RA-Patienten sowohl für Pyd als auch für DPyd im Serum signifikant erhöhte Werte erheben (Furumitsu et al. 2000).

In der Synovialflüssigkeit konnten Müller et al. bei Patienten mit RA eine Spiegelerhöhung zeigen (Muller et al. 1996). In einer anderen Studie der gleichen Arbeitsgruppe gelang es, signifikante Unterschiede der Crosslinkdichte im synovialen Gewebe zwischen aktiver RA im Vergleich zu inaktiver RA und OA darzulegen (Kaufmann et al. 2003).

Bei Müller et al. erfolgte die quantitative Bestimmung der beiden Pyridinium-Crosslinks in der Synovialflüssigkeit, also direkt in dem Medium, in das sie freigesetzt werden (Muller et al. 1996). Dabei konnten sowohl für Pyd als auch für DPyd nachweisbare Konzentrationen ermittelt werden. Es ist sehr schwierig, die Spiegel der verschiedenen Studien miteinander zu vergleichen, da es kein einheitlich standardisiertes Verfahren gibt, welches zur Bestimmung der Werte verwendet wird. Quantitativ liegen die gemessenen Pyd-Spiegel in unserer Untersuchung deutlich über

denen von DPyd. Auch andere Autoren erhielten im Rahmen ihrer Messungen ähnliche Verhältnisse und schlussfolgerten daraus eine gesteigerte Gelenkknorpeldestruktion bei den betroffenen RA-Patienten (Muller et al. 1996, Kaufmann et al. 2003, Furumitsu et al. 2000, Manicourt et al. 2000).

Der Pyd/DPyd-Quotient der Synovialflüssigkeit ist ein hilfreicher Indikator, um Aussagen über den Ursprung der Crosslinks treffen zu können (Muller et al. 1996). Er kann Hinweise auf Störungen wie z. B. vermehrten Knorpelabbau geben (Schmidt-Gayk 1996).

Auch in dieser Arbeit zeigt der Quotient, dass bei der RA nicht nur absolut, sondern auch relativ mehr Pyridinolin als Desoxypyridinolin freigesetzt wird und damit aggressive Abbauprozesse insbesondere der chondrogenen Matrix anzunehmen sind. Astbury fand im Urin bei RA-Patienten ein deutlich erhöhtes Verhältnis von Pyd/DPyd gegenüber der Kontrollgruppe mit Osteoarthritis und erklärten dies mit einer erhöhten Knorpeldegradation (Astbury et al. 1994). Auch Takahashi et al. konnten in verschiedenen Geweben bei RA-Patienten unterschiedlich hohe Pyd/DPyd-Quotienten ermitteln und schlussfolgerten, dass die Urinausscheidung der Crosslinks nicht nur vom Knochenstoffwechsel, sondern auch vom Knorpel- und Synovialstoffwechsel abhängt (Takahashi et al. 1996). Für die stärkeren Anstiege des Quotienten bei der RA im Vergleich zur gesunden Kontrolle machten sie die Synovialitis verantwortlich.

Bei der RA wird die Destruktion des Gelenkknorpels vermutlich durch zytokin- und immunkomplexvermittelte Aktivierung von Makrophagen und Fibroblasten eingeleitet. Diese Zellverbände entwickeln einen tumorähnlichen, destruierenden Charakter und führen zur Pannusbildung an den Gelenkflächen (Fassbender 1998).

Neben den natürlichen Pyridinium-Crosslinks wurde auch ein weiterer Abbaumarker, das COMP, untersucht. COMP ist ein nichtkollagenes Glykoprotein und Bestandteil der EZM des Knorpels. Die Funktion ist noch nicht völlig aufgeklärt. Es scheint aber an der Vernetzung der interterritoriellen Matrix beteiligt zu sein.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass COMP ein geeigneter Marker für die Überwachung des Knorpelverlustes sein kann, sowohl bei tierexperimenteller (Larsson et al. 1997) als auch bei humaner Arthritis und in therapeutischen Interventionsstudien (Pincus et al. 2002, Joosten et al. 1999).

Marti et al. zeigten, dass eine erhöhte Krankheitsaktivität bei RA-Patienten zu erhöhten COMP-Spiegeln in der Synovialflüssigkeit und im Serum führt (Marti et al. 1999). Auch die Gruppe um Momohara konnten für einen Teil von RA-Patienten einen

Zusammenhang zwischen COMP-Spiegeln im Serum und Synovialflüssigkeit und dem Destruktionsgrad der Gelenke nachweisen (Momohara et al. 2004).

Im Zentrum des Interesses unserer Untersuchungen standen neben den Abbaumarkern auch die Advanced Glycation Endproducts. Die AGEs und die durch die AGEs veränderten Proteine sind chemische Verbindungen, die in der Pathogenese chronischer Erkrankungen eine Rolle spielen. Sie werden nichtenzymatisch durch die Reaktion von Carbonylgruppen mit Aminogruppen von Proteinen gebildet. Die in der vorliegenden Arbeit näher untersuchten AGEs sind Pentosidin und CML. Beides sind metall-katalysierte Glucose-Glykoxidationsprodukte. Ihr pathogenetisches Potential vermitteln sie über die Beeinflussung des Redoxzustandes des Gewebes, d.h. Entstehung von oxidativem Stress, durch Erzeugung eines Ungleichgewichtes verschiedener proinflammatorischer Zytokine und durch pathologische Quervernetzung von Proteinen, die dadurch möglicherweise immunogen sein können (Singh et al. 2001, Nawroth et al. 1999, Bierhaus et al. 1998, Wisotzky et al. 1996).

Der Diabetes mellitus und die chronische Niereninsuffizienz sind die Erkrankungen, bei denen die Akkumulation der AGEs am längsten bekannt und am besten erforscht sind (Nawroth et al. 1999, Wisotzky et al. 1996).

Bei unseren untersuchten Probanden wurden solche mit Diabetes mellitus oder Niereninsuffizienz ausgeschlossen, so dass hyperglykämische Bedingungen oder eine renale Ausscheidungsstörung als Ursache einer vermehrten AGE-Akkumulation nicht in Frage kommen.

Bei der pathogenen Wirkung der AGEs sind zwei Mechanismen wichtig (Nawroth et al. 1999). Es entstehen zum Einen extrazellulär Superoxidradikale und außerdem wird über die AGE-RAGE-Interaktion intrazellulär die Signaltransduktion beeinflusst. Dabei kommt es auch in der Zelle zur Vermittlung von oxidativem Stress und zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Damit greifen die AGEs in einen zentralen Mechanismus der Inflammation ein, denn NF- κ B ist ein wichtiger Regulator für die Expression und Synthese von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, Rezeptoren für Gerinnungsfaktoren und Endothelin-1.

Auch die gewebsmodifizierenden Eigenschaften der AGEs auf die EZM können in der Pathogenese von Erkrankungen bedeutsam sein. Durch chemischen Umbau ossärer Proteine können sie das komplexe Remodeling der Knochenmatrix beeinflussen und an der Entstehung der Osteoporose beteiligt sein (Hein et al. 2003, Miyata et al. 1996a,

Miyata et al. 1997). Auch durch die Glykierung des Kollagens, die im physiologischen Maß während des normalen Alterungsprozesses auftritt (Baynes 2001), werden physikochemische und mechanische Eigenschaften verändert (Wang et al. 2002). Der AGE-modifizierte Knorpel wird spröde, vermindert strapazierfähig, verliert die Dehnbarkeit und ist weniger elastisch. Die veränderten Proteine sind außerdem resistenter gegenüber dem proteolytischen Abbau. Dadurch sind AGEs eine mögliche Ursache für den Beginn aber auch die Unterhaltung chronisch-entzündlicher und degenerativer Knochen- und Gelenkserkrankungen.

Das AGE-vermittelte Crosslinking der Aminosäuren, das über das physiologische Maß der Quervernetzung zum Beispiel durch Pyridinium-Crosslinks hinaus geht, kann die Sekundär- und die Tertiärstruktur von Proteinen verändern. Dadurch können immunologisch relevante Neoepitope generiert werden, die vom Immunsystem als körperfremd erkannt werden und zur Initiierung von T-Zell-vermittelten Immunreaktionen führen (Corthay et al. 1998, Corthay et al. 2001).

Da die Bildung von AGEs, wie schon erwähnt, auch physiologischerweise abläuft, kommt es theoretisch ständig zur Generierung von neuen Epitopen. Diese lösen aber nicht in jedem Fall pathologische Immunantworten aus, was vermuten lässt, dass dazu zusätzliche Faktoren wie z. B. bestimmte genetische Konstellationen nötig sind.

In der Pathogenese der RA kann auch ein anderer Prozess wichtig sein, die AGE-RAGE-Interaktion. Eine Vielzahl von Zellen wie Endothelzellen, Muskelzellen, Monozyten, Makrophagen, neuronale Zellen, Osteoblasten, Osteoklasten und Fibroblasten verfügen auf ihrer Oberfläche über spezifische Rezeptoren oder Proteine, die AGEs binden können (Hein 2006, Thornalley 1998, Schmidt et al. 2001). Zu den bisher bekannten Strukturen gehören AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3, ScR-II, CD36 und RAGE (Hein 2006). RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) gehört zur Immunglobulinsuperfamilie und induziert über intrazelluläre Signalmechanismen die Aktivierung von NF- κ B. Dadurch werden vermehrt proinflammatorische Proteine expremiert (Hein et al. 2003, Newkirk et al. 1998). Bei der RA ist NF- κ B nicht nur bei der Regulation von entzündlichen Prozessen wichtig, sondern auch bei der Destruktion und der Degradation von Knorpel und Knochen (Makarov 2001). Die Akkumulation der AGEs hat auch zur Folge, dass die Expression von RAGE selbst gesteigert wird. Da sich an RAGE nicht nur AGEs, sondern auch andere proinflammatorische Moleküle wie HMBG 1 binden können, ist es möglich, die Inflammation über indirekte Wege zu steigern (Hein 2006).

Ligier et al. fanden speziell gegen AGEs gerichtete IgG-Antikörper und unterstreichen damit deren immunologische Bedeutung (Ligier et al. 1998). Möglicherweise haben AGEs auch Einfluss auf die Genexpression und Funktion von multipotenten Stammzellen (MSC) (Hein 2006). Die Arbeitsgruppe um Kume konnte demonstrieren, dass AGEs die Proliferation dieser Zellen inhibieren, die Apoptose induzieren und die Ausreifung der MSCs in die entsprechenden muskuloskelettalen Gewebe verzögern. Diese Mechanismen können zu Störungen der Geweberegeneration und -reparatur führen (Kume et al. 2005).

Es existieren einige Studien, die signifikant erhöhte Serumpentosidinwerte bei RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden ermitteln konnten (Rodriguez-Garcia et al. 1998, Miyata et al. 1998, Takahashi et al. 1997). Auch in der Synovialflüssigkeit gelang es einigen Arbeitsgruppen zu belegen, dass die Pentosidin-Spiegel bei RA im Vergleich zu Arthrosepatienten erhöht sind (Miyata et al. 1998, Chen et al. 1999).

Für die CML-Spiegel im Serum und in der Synovialflüssigkeit existieren keine veröffentlichten Studien bei RA. Eine interdisziplinäre Arbeitsgruppe um Hein und Bräuer hat sich mit der immunhistochemischen Lokalisation beschäftigt und fand bei RA-Patienten eine gehäufte Ablagerung von CML an der synovialen Grenzfläche und an Gefäßendothelien, ebenso in Makrophagen und T-Lymphozyten (Drinda et al. 2002). In seiner Promotionsschrift fand Köhler aus der gleichen Arbeitsgruppe niedrigere CML-Spiegel in der Synovialflüssigkeit als im Serum von RA-Patienten und sogar signifikant niedrigere CML-Serumspiegel als bei Gesunden. Er vermutet, in Kenntnis der Untersuchungen von Drinda et al., eine vermehrte CML-Bindung in der Synovia als Ursache für niedrige Werte in Synovialflüssigkeit und Serum (Koehler 2005).

Eine mögliche Erklärung für die vermehrte AGE-Bildung ist wahrscheinlich im verstärkten Auftreten von oxidativem Stress bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen zu sehen (Chen et al. 1998, Takahashi et al. 1997). Geht man von einer aktiven Synovialitis bei RA aus, kommt es unter anderem durch Aktivierung neutrophiler Granulozyten zur Bildung von Sauerstoffradikalen und Wasserstoffperoxid. Nach Reaktion mit Eisen können weitere Radikale wie Hydroxylradikale entstehen. Auch Hypochloride und Superoxide führen letztendlich zur Bildung reaktiver Carbonylverbindungen, die in Gegenwart von Proteinen und Zuckerderivaten AGE-Verbindungen entstehen lassen (Yan et al. 1994, Sajithlal et al. 1999). Durch oxidative Degradierung von Lipiden in der Synovialflüssigkeit bei RA-Patienten kann es ebenfalls zur Bildung freier Radikale kommen (Rodriguez-Garcia et al. 1998).

Die beiden AGEs standen auch im Interesse von Analysen des Knochenstoffwechsels. In der experimentellen Untersuchung von Miyata und McCarthy konnte gezeigt werden, dass AGEs zu einer Aktivierung des Knochenstoffwechsels führen, wahrscheinlich zytokinvermittelt über AGE-Bindungsmoleküle (Miyata et al. 1996a, McCarthy et al. 1999). Hein berichtet bei Osteoporosepatienten über signifikant positive Korrelationen zwischen Serumpentosidin und histomorphometrischen Parametern der Knochenresorption und schlussfolgert, dass Pentosidin die Aktivität der Osteoklasten beeinflusst und somit zur Pathogenese der Osteoporose beiträgt (Hein et al. 2003). In einer folgenden Studie der gleichen Arbeitsgruppe konnte histomorphometrisch eine negative Korrelation zwischen CML und dem Anteil der osteoblastenbesetzten Knochenoberfläche gefunden werden. Es ist also zu vermuten, dass die Proteinglykierung am Knochen in der Lage ist, beide Prozesse des Remodeling zu beeinflussen: sowohl die osteoklastenassoziierte Knochenresorption als auch die osteoblastenassoziierte Knochenformation (Hein et al. 2006). Auch Franke et al. demonstrierten, dass den AGEs eine funktionelle Rolle bei der Entwicklung von Knochenkrankheiten zuteil wird. Sie wiesen nach, dass Akkumulation von AGEs im Knochen eine Zunahme der mRNA-Expression von RAGE und RANKL, sowie einen Rückgang der mRNA von alkalischer Phosphatase und Osteocalcin bedingen. Durch AGEs werden somit wahrscheinlich die Osteoblasten durch Aktivierung des AGE–RAGE–Signalweges verändert, die Osteoklastenbildung verstärkt induziert und die Matrix-Mineralisation herabgesetzt. (Franke et al. 2007)

Aus den bisher geschilderten Erkenntnissen lässt sich die Hypothese aufstellen, dass bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie der RA AGEs akkumulieren und durch ihre pathogenetische Bedeutung möglicherweise zu einem veränderten Kollagenkatabolismus führen.

Einige Studien konnten zeigen, dass die Rückläufigkeit der systemischen Entzündungsparameter und der Synovialitis nicht zwangsläufig mit einem Rückgang der histopathologisch nachweisbaren Infiltration des Synovialgewebes durch Entzündungszellen einhergeht (Baeten et al. 2006). Andere wiesen darauf hin, dass sich der chronisch ablaufende Entzündungsprozess nicht wesentlich auf den Abbau der EZM auswirkt. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür wäre die Formation von AGEs. In vivo werden bevorzugt Proteine mit langer Halbwertszeit, wie z.B. die Kollagene, durch

nicht-enzymatische Glykierung modifiziert. Die entstandenen Endprodukte zeichnen sich durch ein verändertes biologisches Verhalten aus. Den AGEs wird dabei ein pathogenes Potential zugeschrieben. Durch ihre Bindung an spezielle Rezeptoren (RAGE) führen sie zur Initiierung und Aufrechterhaltung von intrazellulären oxidativem Stress und damit zu einer proinflammatorischen Genexpression über den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Hein et al. 2005). Weiterhin führt die Maillard-Reaktion zu einer zusätzlichen Quervernetzung von Proteinen, die durch dieses Crosslinking einer reduzierten Proteolyse unterliegen und als Neoepitope auch immunogen wirken können (Hein et al. 2006, Hein et al. 2005). Eine durch die beschriebenen Vorgänge veränderte EZM kann so an der Aufrechterhaltung des chronischen Entzündungsprozesses bei der RA beteiligt sein und Veränderungen der Abbauvorgänge aufweisen.

Die Arbeitsgruppe um Verzij et al. untersuchte die Einflüsse der AGEs auf die Kollagenmatrix. Es gelang ihnen zu zeigen, dass die altersbedingte AGE-Akkumulation im Gelenkknorpel besonders hoch ist. Auch die Kollagenase-Verdaubarkeit von Gelenkkollagen sinkt mit zunehmendem Alter proportional zum Ausmaß der Glykierung. Es kommt zur Abnahme des Arginin-, Lysin- und Hydroxylysingehalts im Knorpel infolge zunehmender AGE-Modifizierung mit dem Lebensalter, was zu Versprödung und Verfestigung führt (Verzijl et al. 2000, Verzijl et al. 2002, Verzijl et al. 2001). DeGroot et al. konnten zeigen, dass die Proteoglykansynthese negativ mit dem AGE-Gehalt des Knorpels korreliert und schließen daraus eine verminderte Syntheseleistung der Chondrozyten (DeGroot et al. 1999, DeGroot et al. 2001b). Der Arbeitsgruppe gelang auch als erstes der Nachweis, dass die EZM des Knorpels ihre Anfälligkeit für den proteolytischen Abbau durch MMPs verliert, wenn sie durch AGEs verändert wurde (DeGroot et al. 2001a).

In unseren Untersuchungen fanden wir einen signifikant positiven Zusammenhang zwischen dem Pentosidin-Spiegel der Synovialflüssigkeit und dem Pyd-Spiegel.

Eine weitere positive Korrelation, die als signifikant zu werten ist, ergibt sich zwischen dem Pentosidin und dem DPyd. Hohe Pentosidin-Werte bedeuten tendenziell höhere Pyd- und DPyd-Werte und umgekehrt.

Die negative Korrelation des Pentosidins mit dem Crosslink-Quotienten verfehlt das Signifikanzniveau, ebenso die schwach positive Zusammenhangsanalyse von Pentosidin und COMP.

Der CML-Spiegel zeigt einen negativen signifikanten Zusammenhang mit dem Pyd/DPyd-Quotienten. Ebenfalls negativ ist die Beziehung CML und Pyd, allerdings ist das Ergebnis nicht signifikant. Die Zusammenhänge CML – DPyd und CML – COMP sind positiv aber nicht signifikant.

Die Korrelationsanalyse der proteinbezogenen AGEs mit den Crosslinks und dem COMP zeigen tendenziell in die gleiche Richtung, erreichen allerdings keine signifikanten Ergebnisse. Eine Ausnahme davon ist die positive Korrelation des proteinbezogenen Pentosidins mit dem Pyd. Sie ist signifikant.

Wir gehen von der Annahme aus, dass der Proteingehalt der Synovialflüssigkeit von vielen Faktoren bestimmt wird. Es kann z. B. durch die Inflammation zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität kommen. Dadurch wäre ein vermehrter Einstrom von Proteinen möglich, der zwar den nachweisbaren Eiweißgehalt ändern könnte, allerdings keinen Einfluss auf die verschiedenen stark AGE-modifizierten langlebigen Proteine hätte. Deshalb werden wir in der weiteren Diskussion vor allem die erstgenannten Ergebnisse erläutern.

Die Korrelation des Pentosidins mit dem Pyd könnte die Hypothese, dass die AGE-modifizierten Proteine Abbauprozesse intensivieren, bestärken. Der Zusammenhang mit dem DPyd und der negative (wenn auch nicht signifikante) Zusammenhang mit dem Pyd/DPyd-Quotienten lassen vermuten, dass eine stärkere Beziehung zum Knochenabbau, zum Beispiel durch eine verstärkte Osteoklastenaktivität, vorliegt.

Aus dem negativen Zusammenhang des CMLs mit dem Crosslinkquotienten könnte man ebenfalls schlussfolgern, dass sich eine CML-Anreicherung mehr auf den Knochenabbau als auf den Knorpelmetabolismus auswirkt, zumindest relativ gesehen. Über das quantitative Verhältnis lässt sich anhand des Quotienten keine Aussage treffen.

Die aufgestellte Hypothese würde auch die fehlenden Signifikanzen bei den Zusammenhangsanalysen von Pentosidin bzw. CML mit dem COMP erklären, welches bei Degradationsprozessen der Knorpelmatrix freigesetzt wird.

In der Literatur finden sich keine vergleichbaren Studien, die Synovialflüssigkeit als Untersuchungsmaterial verwenden. Takahashi wies zwar nach, dass Pyd, DPyd und Pentosidin gemeinsam in Gelenkknorpel und Gewebelysaten vorkommen, setzte sie aber nicht miteinander in Beziehung (Takahashi et al. 1995, Takahashi et al. 1994).

Wedler hat untersucht, ob es Zusammenhänge der Pyridinium-Crosslinks im Urin mit den Serum-AGEs Pentosidin und CML gibt. Es fanden sich keine signifikanten Korrelationen, weder bei RA- noch bei Arthritis-psoriatica-Patienten (Wedler 2006). Ihre Interpretation der Ergebnisse bestand darin, dass die AGEs einerseits ein zusätzliches Crosslinking der Proteine bewirken und damit eine erhöhte Proteolyseresistenz besteht. Dies hätte einen verminderten Kollagenabbau mit geringerer Crosslink-Ausscheidung zur Folge. Andererseits führt die Akkumulation von AGEs zur Expression von RAGE an multiplen Zellen. Damit besteht die Möglichkeit, dass sich nicht nur AGEs, sondern auch proinflammatorische Moleküle wie HMGB 1 an diesen Rezeptor binden und eine langfristige NF- κ B-Aktivierung der Zellen auslösen. Dies hätte eine verstärkte Synthese proinflammatorischer Zytokine und einen eher verstärkten Kollagenabbau zur Folge. Beide Mechanismen zusammengenommen könnten sich gegenseitig neutralisieren, was die fehlende Korrelation von AGE-Spiegeln und Crosslinks erklären würde.

Die Arbeitsgruppe um Franke et al. konnte zeigen, dass AGEs die mRNA-Expression von RAGE, RANKL und verschiedenen Osteoblasten-Genen in humanen Osteoblasten-Zellkulturen beeinflussen (Franke et al. 2007). Sie bewiesen, dass AGE-Akkumulation im Knochen die Osteoblasten durch die Aktivierung des AGE-RAGE Signalweges verändert und die Matrix-Mineralisation beeinträchtigt. Außerdem zeigten sie eine erhöhte RANKL-mRNA-Expression der Osteoblasten. RANKL gilt als Schlüsselsignal der Osteoklastenformation, -fusion, -aktivierung und des Überlebens (Hofbauer und Heufelder 2001). Das von der Arbeitsgruppe gefundene Ergebnis könnte bedeuten, dass AGEs in vivo wichtige Induktoren der RANKL-vermittelten Osteoklastogenese sind und zur beschleunigten Knochenresorption beitragen (Franke et al. 2007). Diese Studie kann die Resultate unserer Arbeit unterstützen, denn vermehrte Knochenresorption lässt die Abbaumarker Pyd und vor allem DPYD ansteigen.

Dass sich bei RA sowohl eine periartikuläre als auch eine systemische gelenkferne Osteoporose entwickelt, gilt als gesichert (Hein 2001, Bottcher et al. 2006, Oelzner et al. 1999, Grassi et al. 1998, Gough et al. 1994). Die radiologisch erkennbare gelenknahe Osteoporose zählt zu den röntgenologischen Frühzeichen (Backhaus und Scheel 2006). In den ersten zehn Jahren zeichnet sich die RA durch einen Knochenmassenverlust aus, der bis zu 10 % betragen kann (Hein et al. 1997). Die Ursachen der Osteoporose sind vielfältig. So können krankheitsbedingte Immobilisation, erhöhtes Alter, Therapie mit Glukokortikoiden und postmenopausales Östrogenföizit eine Rolle spielen. Der lokale

Knochenabbau wird durch die Stimulation der gelenknahen Osteoklasten bewirkt (Bernhard und Villiger 2001). Dass dabei das RANK/RANKL/OPG-System von Bedeutung ist, konnte durch viele Studien auch bei RA gezeigt werden (Haynes et al. 2001, Skoumal et al. 2005, Hein et al. 2008, Oelzner et al. 2007, Gravallesse 2002). Durch die Studie von Franke et al. könnte man durchaus die vermehrte AGE-Bildung, die bei RA durch den erhöhten oxidativen Stress resultiert, als ätiologischen Faktor der Entwicklung einer Osteoporose bei der RA vermuten. Besonders könnte man schlussfolgern, dass die AGEs in das zentrale „Steuersystem“ RANK/RANKL/OPG eingreifen.

Bei der Beurteilung unserer Ergebnisse muss man berücksichtigen, dass über die Kinetik der Freisetzung der untersuchten Substanzen aus dem Gewebe in die Synovialflüssigkeit bisher wenig bekannt ist. Auch die Mechanismen des Abtransportes in die Blutzirkulation und die Eliminationswege sind unbekannt. Daher ist es nicht klar, ob und wie schnell Veränderungen der Konzentration und damit auch eventueller Zusammenhänge erkennbar werden. Andere Störfaktoren, wie z.B. eine mögliche zirkadiane Variabilität der Kollagen-Crosslinkausscheidung, die im Urin bekannt ist (Aoshima et al. 1998), sind in der Synovialflüssigkeit ebenso schwer zu beurteilen.

Nicht unerwähnt bleiben soll die Tatsache, dass die bestehenden Korrelationen Pentosidin – Pyridinolin und proteinbezogenes Pentosidin – Pyridinolin keine signifikanten Level erreicht hätten, wenn die Ausreißer, die unter 5.1.1 und 5.2.1 beschrieben wurden, in die Analyse mit einbezogen worden wären. Es verbleibt also bei der Deutung ein Rest Unsicherheit mit einem spekulativen Aspekt.

Zusammenfassend ist trotzdem zu konstatieren, dass die oben aufgeführte Hypothese, dass eine verstärkte AGE-Bildung die Kollagendegradation erhöht, anhand der Ergebnisse der Arbeit zwar nicht zweifelsfrei bestätigt werden konnte, aber zumindest als wahrscheinlich gelten kann, dass vor allem der Knochenabbau durch AGE-Generation/Akkumulation gesteigert wird.

Es bedarf weiterführender Studien, um den möglicherweise komplexen Einfluss der AGE-Akkumulation auf den Kollagenmetabolismus sowohl im Knorpel als auch im Knochen zu klären. Ferner ist es notwendig, noch präziser die einzelnen formativen und degradativen Marker zu evaluieren, ebenso das Metabolisierungs- und Eliminationsverhalten und weitere Einfluss- und Störfaktoren (Smolen et al. 2008).

Dazu sind entsprechend groß angelegte Studien unter standardisierten Bedingungen nötig (Sinigaglia et al. 1995). Ohne eine Verbesserung von Sensitivität und Spezifität sowie einer Standardisierung der Messmethoden mit einheitlichen alters- und geschlechtsabhängigen Referenzbereichen (Verhoeven et al. 2001) erscheint die breite routinemäßige Anwendung biochemischer Marker bei rheumatologischen Erkrankungen als nicht sinnvoll.

6.2 Die Beziehungen der Abbaumarker untereinander

Die Bedeutung der Abbaumarker bei der RA wurde bereits im Abschnitt 6.1 diskutiert. Hier soll der Fragestellung nachgegangen werden, ob es Zusammenhänge der Abbaumarker untereinander gibt.

Die Korrelationsanalyse der beiden natürlichen Pyridinium-Crosslinks ergab in dieser Arbeit eine schwach positive Korrelation, erreicht aber keine Signifikanz.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Kaufmann et al., sie wiesen einen signifikanten positiven Zusammenhang der Kollagen-Crosslinks untereinander im synovialen Gewebe nach, allerdings nicht im Urin, im Serum oder in der Synovialflüssigkeit (Kaufmann et al. 2003). In anderen Studien konnten hingegen signifikant positive Korrelationen von Pyd mit DPyd sowohl in der Synovialflüssigkeit (Furumitsu et al. 2000) als auch im Urin (Wedler 2006) gezeigt werden. Hohe Pyd-Werte sprachen in dem Fall für höhere DPyd-Werte und umgekehrt. Die Autoren werteten die Beziehung des als relativ knorpelspezifisch geltenden Pyds zum eher knochenspezifischen DPyd als Beleg für das parallele Auftreten von Knorpel- und Knochendestruktion. Dass die Korrelation in dieser Arbeit kein signifikantes Niveau erreicht, liegt eventuell an Einflussfaktoren wie einer zusätzlich bestehenden postmenopausalen Osteoporose, die sich vor allem auf die DPyd-Spiegel auswirken würde. Ein generelles Problem der Knochen- bzw. Knorpelmarker ist, dass sie nicht zwischen gelenknahen und systemischen Prozessen differenzieren können (Hein 2001).

Durch die Möglichkeit der medikamentösen Beeinflussung des „Vor-Ort-Geschehens“ und der Reduktion des Kollagenabbaus ergibt sich auch für die Beurteilung der Abbaumarker eine Schwierigkeit. Okazaki et al. konnten im Tierexperiment einen geringeren Verlust der trabekulären Knochenmasse durch die Therapie mit Glukokortikoiden nachweisen (Okazaki et al. 1998). In vivo zeigten andere Studien eine

verminderte Ausscheidung der Kollagen-Crosslinks Pyd und DPyd unter der Therapie mit Prednisolon und DMARDs bei RA-Patienten in verschiedenen Erkrankungsstadien (Verhoeven et al. 2001, Seibel et al. 1989). Die genannten Studien geben Beispiele dafür, in welchem Ausmaß man die Destruktionsvorgänge in den betroffenen Gelenken medikamentös beeinflussen kann. Es ist wahrscheinlich, dass die Parameter durch Pharmatherapie moduliert wurden, allerdings ist es aufgrund der individuell sehr variablen Therapiekonzepte nur schwer möglich, diese Störgröße zu eliminieren.

Eine weitere Einflussgröße könnte die Art der bestehenden Synovialitis sein. Eine 2008 veröffentlichte Studie zeigte, dass RA-Patienten mit einem Synovialitis-Typ II (nach dem Graduierungsschema von P. Stiehl) einen erhöhten Pyd-Gehalt in Synovialgewebeproben im Vergleich zu Synovialitis-Typ I aufwiesen (Wernicke et al. 2008). Für DPyd konnten diese Unterschiede nicht gezeigt werden und auch in der Synovialflüssigkeit ergaben sich keine signifikanten Unterschiede unter den verschiedenen Typen. Dennoch deutet die Arbeit an, dass man Zusammenhänge eventuell nicht pauschal bei der Diagnosegruppe „Rheumatoide Arthritis“ findet, sondern nur bei Subgruppen, die ein bestimmtes Merkmal aufweisen.

Bei der Zusammenhangsanalyse des COMP vermuteten wir, dass sich dieser Abbaumarker aufgrund der Zugehörigkeit zu der Knorpel-EZM im Rahmen destruktiver Prozesse bei der RA ähnlich verhält wie die Kollagen-Crosslinks.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es einen signifikant positiven Zusammenhang zwischen Pyd und COMP sowie dem Pyd/DPyd-Quotienten und COMP gibt. Dies spricht für eine Kopplung im Abbau beider Strukturproteine.

Auch Thom konnte diese Zusammenhänge mit dem nichtkollagenen Glykoprotein COMP ermitteln (Thom 2008). Einige Arbeitsgruppen kamen in der Vergangenheit zu dem Schluss, dass sowohl die Kollagen-Crosslinks für sich (Hein et al. 1997) als auch das COMP für sich (Vilim et al. 1997, Neidhart et al. 1997, Skoumal et al. 2006, Skoumal et al. 2003) als vielversprechende Parameter vor allem des Knorpelumsatzes gelten können.

Unsere Ergebnisse konnten die Vermutung bestätigen, dass sich beide Parameter als Bestandteile der EZM beim pathologisch gesteigerten Abbau gleichsinnig verhalten bzw. in positiver Beziehung zueinander stehen. In der Literatur finden sich hierzu wenig direkte Vergleichsmöglichkeiten. In einer Studie konnte ein Zusammenhang zwischen COMP und N-terminal-Telopeptid-Crosslink(NTX)-Spiegeln nachgewiesen werden

(Kelman et al. 2006). Die Arbeitsgruppe fand ein gesteigertes Risiko für die Entwicklung einer progredienten Coxarthrose in Verbindung mit erhöhten Serumspiegeln beider Parameter bei älteren hellhäutigen Frauen.

Bei der Untersuchung der COMP-Spiegel weisen einige Autoren auch auf eventuelle Schwierigkeiten hin. So konnten Recklies et al. zeigen, dass die COMP-Spiegel in Serum und Synovia starken Schwankungen unterworfen sind. Durch eine in-vitro-Untersuchung stellten sie fest, dass neben den Chondrozyten auch synoviale Fibroblasten COMP produzieren können (Recklies et al. 1998). Dodge et al. kamen ebenso zu dem Resultat, dass auch andere mesenchymale Zellen zur Synthese von COMP befähigt sind (Dodge et al. 1998). Beide Arbeitsgruppen stellen deshalb die Eignung der COMP-Bestimmung als reiner Gelenkknorpelmarker in Frage. Auch bei den Crosslinks gibt es Arbeitsgruppen, die den Nutzen der Bestimmung in Frage stellen. Pearce et al. zeigten, dass die im Urin bestimmte Crosslink-Menge durch nichtossäre Stoffwechselvorgänge beeinflusst wird (Pearce et al. 1995).

Es ist momentan noch schwierig abzuschätzen, inwieweit sich der Abbau bzw. die Elimination von COMP aus der Synovialflüssigkeit auf die dort gemessenen Spiegel auswirkt. Zur Zeit sind die molekularen Mechanismen und die verantwortlichen Enzyme des COMP-Abbaus größtenteils unbekannt (Liu et al. 2006b). Es scheinen aber spezielle MMPs eine Rolle zu spielen, so zum Beispiel die ADAMTS (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs) 7 und 12 (Liu et al. 2006a, Liu et al. 2006b).

Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass nicht nur theoretisch vermutete Verbindungen zwischen kollagenen und nichtkollagenen Abbaumarkern bestehen, sondern sich diese „direkt am Ort des rheumatischen Geschehens“, in der Synovialflüssigkeit, auch belegen lassen. Die Korrelationen der Kollagen-Crosslinks mit dem Glykoprotein COMP lassen die Interpretation zu, dass der Knorpelabbau eine wesentliche Rolle bei der RA spielt und von knöchernen Erosionen begleitet wird. Diese Mechanismen werden in den Erläuterungen der Pathogenese und Klinik der RA auch in der Literatur beschrieben.

Es soll allerdings auch erwähnt werden, dass die in der Arbeit gefundenen Zusammenhänge der Abbaumarker noch keiner streng kritischen Betrachtung standhalten. Möglicherweise hängen die Marker von schwer zu kontrollierenden Einflussfaktoren ab, die Zusammenhänge abschwächen können. Es ist daher kaum

möglich, Aussagen über Wechselwirkungen und Beeinflussungen mit statistischer Sicherheit zu treffen.

Die diagnostische Relevanz der Parameter dürfte damit momentan kritisch zu hinterfragen sein. Es sind sicher weitere Untersuchungen nötig, um die zweifelsohne vielversprechenden Ansätze weiter auszubauen und die Bedeutung von Einflussfaktoren zu ermitteln.

6.3 Die Beziehungen der AGEs untereinander

Die Bedeutung der AGEs für die RA ist umfassend im Abschnitt 6.1 erläutert. In diesem Absatz wird analysiert, ob die AGE-Spiegel bei RA-Patienten miteinander in Beziehung stehen.

In der vorliegenden Arbeit ergaben sich keine Korrelationen zwischen den beiden AGEs Pentosidin und CML. Es gibt in der Literatur keine vergleichbaren Untersuchungen in der Synovialflüssigkeit. Offensichtlich unterliegen die verschiedenen AGE-Verbindungen differenten Bedingungen für deren Generation und auch differenten Bindungsmechanismen bzw. einem unterschiedlichen Metabolismus.

Im Serum konnte Wedler signifikante Korrelationen zwischen Pentosidin und CML nachweisen (Wedler 2006). Möglicherweise ist die Diskrepanz der Ergebnisse in der Analyse der verschieden Untersuchungsmaterialien begründet.

Vielleicht war unsere Studiengruppe aber auch zu klein, um bestehende Zusammenhänge nachzuweisen.

Die Generierung der AGEs unterliegt vielen Einflüssen, so kommt es z. B. darauf an welche Aminosäuren glykiert werden, aber auch die Substanzen, die an der Entstehung des oxidativen Milieus mitwirken, sind wichtig. So konnte gezeigt werden, dass bei RA-Patienten das Verhältnis von Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure zu Gunsten der Dehydroascorbinsäure verändert ist (Lunec und Blake 1985). Die Dehydroascorbinsäure wird als Präkursor für die Pentosidinbildung angesehen (Nagaraj et al. 1991). Die Bildung der AGEs wird von vielen Faktoren beeinflusst, die nicht nur die Höhe der AGE-Spiegel bestimmen, sondern auch die Art der AGEs. Um die Zusammenhänge endgültig zu klären, sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

6.4 Einfluss des Alters

Über die Abhängigkeit der Crosslink-Spiegel vom Alter findet man in der Literatur keine einheitlichen Angaben. Bei Normalpersonen berichten Mora et al. ähnlich wie Ohishi et al. über eine vermehrte Ausscheidung in der präpubertären Phase im Rahmen des Wachstumsprozesses (Ohishi et al. 1993, Mora et al. 1999). Bis zur Pubertät sinkt dann der Spiegel wieder und bleibt im weiteren Verlauf nach einem kurzen Peak in der Pubertät auf einem konstant niedrigen Niveau (Mora et al. 1999). Eyre et al. berichteten über einen Anstieg des Pyd-Gehaltes im menschlichen Knorpel während des Skelettwachstums und über konstante Spiegel beim Erwachsenen (Eyre et al. 1988). Einen kontinuierlichen Anstieg der Werte mit der Menopause fand die Arbeitsgruppe um Kushida et al. (Kushida et al. 1995). Gerrits et al. kamen jedoch zu gegenteiligen Ergebnissen. In ihrer Langzeitstudie kam es in den ersten 5 Jahren der Menopause zu einem Anstieg der Crosslink-Elimination, gefolgt von einem Abfall in den nächsten 5 Jahren (Gerrits et al. 1998). Bei Männern wurde in Verbindung mit sinkenden Androgenspiegeln im Laufe des Alterungsprozesses ein Rückgang der Ausscheidung beobachtet (Thomas et al. 1999, Fatayerji und Eastell 1999). Eine Studie von Marti et al. konnte zeigen, dass mit zunehmendem Alter der COMP-Wert in der Synovialflüssigkeit bei männlichen RA-Patienten abnimmt (Marti et al. 1999). Sie sehen es als Ausdruck dafür, dass höheres Alter mit der Zunahme der Gelenkzerstörung und Abnahme der funktionellen Kapazität einhergeht.

In unseren Untersuchungen fanden wir positive Korrelationen des Alters mit beiden Crosslinkswerten, aber nur die Korrelation mit Pyd ist als signifikant zu bewerten. Der Zusammenhang Alter – Crosslinkquotient und Alter – COMP ist schwach positiv, aber nicht signifikant. Ursache für die altersbedingten Veränderungen könnten die im Alter zunehmend auftretenden degenerativen Prozesse sein, die vor allem zum Knorpel- aber auch zum Knochenabbau führen und damit zur Pyd-Erhöhung. Der, in unseren Untersuchungen mit RA-Patienten, fehlende Zusammenhang zwischen AGEs und den DPyd-Spiegeln könnte durch die Vermutung erklärt werden, dass bei den jungen RA-Patienten die gelenknahe Knochendestruktion überwiegt und bei Älteren die systemische Osteoporose vermehrt zu erhöhten DPyd-Spiegeln führt. Dadurch wäre quasi der DPyd-Spiegel unabhängig vom Alter erhöht, lediglich die zugrundeliegenden Mechanismen wären verschieden.

In anderen Studien zum Verhalten von Crosslinks bei RA konnten bei Erwachsenen keine Abhängigkeiten vom Alter festgestellt werden (Kaufmann et al. 2003, Takahashi et al. 1995, Takahashi et al. 1994, Wedler 2006, Seibel et al. 1989, Beardsworth et al. 1990). Hierbei ist allerdings anzumerken, dass die Studien andere Untersuchungsmaterialien, also Urin, Knorpel, Gewebelydrolysate und Synovialgewebe, analysiert haben und daher die Vergleichbarkeiten eingeschränkt sind.

Wahrscheinlich ist, dass bei Patienten mit Erkrankungen des Skelettsystems krankheitsbedingte Veränderungen im Kollagenabbau die reine Altersabhängigkeit maskieren.

Die Bedeutung der AGE-Proteine für den Alterungsprozess wurde in zahlreichen Studien untersucht und ist unumstritten. Es kommt mit zunehmendem Alter zu einer Akkumulation von AGEs, vor allem in langlebigen Proteinstrukturen (Baynes 2001, Wells-Knecht et al. 1995, Wisotzky et al. 1996). Durch die AGE-Modifikation kommt es zu Konformitäts- und Funktionsänderung der Substanzen, welche in der Pathogenese oder den Folgen verschiedener Krankheiten bedeutsam werden können.

Verschiedene Arbeitsgruppen fanden eine Anreicherung von Pentosidin und CML im Gelenkknorpel mit dem Alter (DeGroot et al. 1999, Verzijl et al. 2000). Auch Hein et al. konnten nachweisen, dass bei Gesunden mit zunehmendem Alter die beiden AGE-Spiegel im Serum signifikant ansteigen, nicht jedoch bei Patienten mit Osteoporose (Hein et al. 2003). Zu dem gleichen Ergebnis der Korrelation Alter – Pentosidin im Serum kommen Rodriguez-Garcia et al. bei der RA (Rodriguez-Garcia et al. 1998). Keinen Zusammenhang von Alter und CML fand Wedler im Serum bei RA-Patienten (Wedler 2006).

Die vorliegende Arbeit kommt bei der Untersuchung von Synoviaprobe n bei RA-Patienten zu ähnlichen Resultaten. Es gibt keine signifikante Korrelation des Alters mit dem Pentosidin, auch beim CML lassen sich keine Unterschiede bezüglich des Alters feststellen.

Demgegenüber steht eine Studie von Takahashi et al., die signifikant positive Zusammenhänge zwischen Pentosidin und dem Alter im Gelenkknorpel fanden (Takahashi et al. 1994). Allerdings wurde in der Studie das Gesamtkollektiv, bestehend aus Patienten mit RA, OA, Osteoporose, Femurkopfnekrose und renaler Osteodystrophie mit dem Alter in Beziehung gesetzt, so dass für die RA an sich keine Aussagen zu treffen sind.

Es ist sehr naheliegend, dass die Krankheitsprozesse der RA die Bildung, Bindung oder Elimination der AGEs derart stark beeinflussen, dass der „normale AGEing Prozess“ überlagert wird.

6.5 Einfluss des Geschlechtes

Es ist bei verschiedenen Erkrankungen bekannt, dass es geschlechtsspezifische Unterschiede in der Pathogenese oder dem Krankheitsverlauf gibt. Auch bei der RA stehen solche möglichen Einflüsse auf den Skelettmetabolismus seit längerer Zeit im Interesse von wissenschaftlichen Analysen. Deshalb war es ein weiteres Anliegen dieser Studie zu ermitteln, ob geschlechtsabhängige Unterschiede in den Ergebnissen vorhanden sind.

Bei der RA sind Frauen im Verhältnis 3:1 häufiger betroffen als Männer. Das Geschlechtsverhältnis des Patientenkollektives dieser Arbeit befindet sich etwa in diesem Bereich. Einige Publikationen kommen zu dem Ergebnis, dass die RA beim weiblichen Geschlecht insgesamt schwerere verläuft (Forslind et al. 2007, Tengstrand et al. 2004), was aber nicht unumstritten ist.

Betrachtet man die Mediane der ermittelten Crosslink-, COMP- und AGE-Werte getrennt nach Geschlecht, finden sich in unserer Studie bei den Männern tendenziell höhere Werte als bei Frauen. Allerdings sind die Unterschiede nicht so prägnant, dass sie ein signifikantes Niveau erreichen.

Einen ähnlichen Trend für die Crosslinks und das COMP, allerdings mit signifikant erhöhtem Pyd-Wert der Männer, zeigen die Untersuchungen von Thom (Thom 2008). Als Ursache für diese Tendenz nimmt er ein höheres Risiko des männlichen Geschlechts für knöcherne Erosionen und einen akzelerierten Krankheitsverlauf an, wie dies in einer früheren Studie von Weyand et al. beschrieben wurde (Weyand et al. 1998).

Einheitliche Angaben zu geschlechtsspezifischen Unterschieden lassen sich aus der Literatur nicht entnehmen. Die Arbeitsgruppen um Beardsworth, Seibel, Müller und Astbury fanden keine Geschlechtsunterschiede bezüglich der Crosslink-Ausscheidung im Urin bei Patienten mit RA (Beardsworth et al. 1990, Seibel et al. 1989, Muller et al. 2003, Astbury et al. 1994). Auch Wedler konnte für die Crosslinkwerte und den

Pyd/DPyd-Quotienten im Urin bei RA keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern feststellen. Del Campo et al. fanden bei Frauen einen signifikanten Anstieg der Kollagen-Crosslinkausscheidung, vor allem des DPyd, im Urin mit der Menopause und bei Osteoporose (Del Campo et al. 1999). Takahashi et al. konnten dies in ihrer Studie bestätigen (Takahashi et al. 1999).

Bei den COMP-Werten stimmen unsere Untersuchungen mit denen anderer Autoren überein, die keine Unterschiede der COMP-Spiegel zwischen Männern und Frauen im Serum oder der Synovialflüssigkeit nachweisen konnten (Marti et al. 1999, Neidhart et al. 1997, Mansson et al. 2001).

Angaben über Geschlechtsunterschiede bei AGE-Proteinen finden sich in der Literatur nur vereinzelt. Die Arbeitsgruppe um Takahashi vermutete bei Frauen in der Postmenopause aufgrund des erhöhten Knochenstoffwechsels einen Anstieg der AGEs, insbesondere des Pentosidins. Sie konnten aber in ihren Studien im Vergleich von prä- und postmenopausalen Frauen keine signifikanten Erhöhungen des Pentosidins feststellen (Takahashi et al. 2000). Wedler konnte im Serum signifikant höhere CML-Werte bei Frauen im Vergleich zu Männern ermitteln. Für Pentosidin ergaben sich keine Unterschiede (Wedler 2006).

Auch in unserer Analyse zeigten sich keine signifikanten Differenzen des Pentosidins und auch nicht des CMLs in Abhängigkeit vom Geschlecht.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse muss beachtet werden, dass unser Männerkollektiv eine geringe Anzahl an Probanden aufweist. Ebenso berücksichtigt werden muss die Möglichkeit, dass die RA selbst durch ohnehin gesteigerte Spiegel der untersuchten Stoffe geschlechtsspezifische Unterschiede maskiert.

Neben dem Vergleich der Spiegel zwischen Frauen und Männern haben wir auch die Korrelationen getrennt nach Geschlecht untersucht. Dabei ist aufgefallen, dass die Korrelationen, die in der Gesamtanalyse signifikant waren, meist auch in der Gruppe der Frauen das Signifikanzniveau erreichten, allerdings nicht in der Männergruppe. Dies gilt für die positiven Beziehungen Pyd – COMP, Crosslink-Quotient – COMP, Pentosidin – DPyd und die negative Beziehung CML – Crosslink-Quotient.

Wir vermuten als Ursache die niedrige Anzahl der männlichen Probanden und nicht unbedingt die Geschlechtsdifferenz. Am deutlichsten wird der Einfluss der Probandenzahl sicher bei den Korrelationen Pentosidin – Pyd sowie proteinbezogenes Pentosidin – Pyd. In dem Gesamtkollektiv ergeben sich signifikant positive

Zusammenhänge, die sich aber nicht in den Gruppen getrennt nach Geschlecht reproduzieren lassen.

Für die Korrelation Pentosidin – DPyd könnte man vermuten, dass bei den Frauen eine postmenopausale Osteoporose die DPyd-Spiegel erhöht und sich damit die Korrelation nur bei den Frauen (und im Gesamtkollektiv) nicht aber bei den Männern ergibt.

Eine Korrelation, die sich im Gesamtkollektiv nicht zeigt, allerdings in der Frauengruppe signifikant positiv wird, ist die Analyse CML – DPyd. Im Männerkollektiv ergibt sich für diese Untersuchung ein diskret negativer Korrelationskoeffizient, der im Gesamtkollektiv eventuell dazu führt, dass kein signifikantes Niveau erreicht wird.

Zusammenfassend vermuten wir, dass die in der Studie gezeigten Differenzen der Korrelationen bei Frauen und Männern teilweise oder überwiegend durch die niedrige Anzahl der männlichen Probanden begründet werden und wahrscheinlich nicht als geschlechtsabhängige Unterschiede zu werten sind.

7 Schlussfolgerung

Das vorliegende Manuskript befasst sich mit den Abbaumarkern des Knorpel- und Knochenstoffwechsels Pyd, DPyd und COMP sowie mit den AGEs Pentosidin und CML in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten, erfasst also Beziehungen diesbezüglicher Messwerte und Auffälligkeiten „nahe am Ort des Geschehens“.

In der Arbeit konnte bei RA-Patienten gezeigt werden, dass die gemessenen Pyd-Spiegel quantitativ absolut und relativ über den DPyd-Spiegeln liegen und ein hoher Crosslink-Quotient besteht, was eine vermehrte Gelenkknorpeldestruktion wahrscheinlich macht. Außerdem konnten wir signifikant positive Korrelationen zwischen Pyd und COMP nachweisen, ebenso zwischen dem Pyd/DPyd-Quotienten und COMP. Damit können unsere Ergebnisse die Vermutung bestätigen, dass sich die beiden Abbauprodukte als Bestandteile der EZM beim pathologisch gesteigerten Kollagenabbau gleichsinnig verhalten.

Den AGEs wird bei der RA ein pathogenetisches Potential zugesprochen, in dem sie befähigt sind, intrazellulären oxidativen Stress zu initiieren und Entzündungsreaktionen aufrechtzuerhalten. Außerdem können sie durch Protein-Modifizierungen, die bevorzugt an langlebigen Proteinen wie Kollagen stattfinden, die physikochemischen Eigenschaften des Gewebes verändern. In der vorliegenden Arbeit konnten zwischen den AGEs Pentosidin und CML keine signifikanten Korrelationen nachgewiesen werden. Möglicherweise unterliegen die beiden Verbindungen differenten Bildungsmechanismen oder -bedingungen bzw. einer unterschiedlichen Metabolisierung.

Bei der Analyse der Beziehung der Kollagen-Crosslinks und des COMP als Abbaumarker von Knochen bzw. Knorpel einerseits und den AGEs andererseits konnten statistisch signifikante Ergebnisse ermittelt werden. So korreliert der Pentosidin-Spiegel positiv mit dem Pyd-Spiegel. Dieses Ergebnis könnte die Hypothese stützen, dass eine Akkumulation von AGE-modifizierten Proteinen zu einem vermehrten Abbau der betroffenen Gewebe führt. Aus dem positiven Zusammenhang Pentosidin – DPyd und der negativen Korrelation CML – Crosslink-Quotient könnte man schlussfolgern, dass sich die AGE-Modifikation mehr auf den Knochenabbau als auf den Knorpelkatabolismus auswirkt. Anhand von Studien konnte gezeigt werden, dass sich erhöhte AGE-Spiegel auf Osteoblasten- und Osteoklasten-Funktionen auswirken. Möglicherweise sind die AGEs in der Lage, das zentrale Steuersystem des

Knochenmetabolismus, das RANK/RANKL/OPG-System, zu beeinflussen. Man könnte aufgrund der Ergebnisse also die vorsichtige Vermutung äußern, dass die AGE-Veränderungen eine Ursache nicht nur der periartikulären Demineralisierung und der Knochendestruktion darstellen, sondern auch der systemischen Begleitosteoporose. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss allerdings angemerkt werden, dass über die Bildungs-, Bindungs-, Metabolisierungs- und Eliminationsprozesse der einzelnen Substanzen bisher nur wenig bekannt ist. Inwieweit eine genetische Disposition, die Beeinflussung durch Medikamente, Krankheitsdauer und zirkadiane Rhythmik auf die hier untersuchten Parameter Auswirkung haben, kann ebenfalls nicht beantwortet werden. Allgemeingültige Aussagen über ihre Einflüsse auf die Messdaten bedürfen separater Klärung.

Bei den geschlechtsspezifischen Untersuchungen fanden sich in der Männergruppe bei allen Messwerten die höheren Mediane. Der Unterschied zu den Frauen war allerdings als nicht signifikant zu werten. Im Gegensatz dazu fanden sich die signifikanten Korrelationen, die sich in der Gesamtgruppe ergeben hatten, im Frauenkollektiv aber nicht in der Männergruppe. Wir vermuten allerdings, dass die hier aufgezeigten Differenzen in der niedrigen Anzahl der Probanden im Männerkollektiv begründet liegen und nicht in geschlechtsspezifischen Unterschieden.

In der Untersuchung des Alterseinflusses erreichte die Korrelation Alter – Pyd Signifikanz. Wir vermuten, dass im Alter zusätzlich degenerative Prozesse auftreten, die vor allem zum Knorpelabbau führen. Für die übrigen Abbaumarker und die AGEs ließen sich keine Zusammenhänge mit dem Alter nachweisen. Die Höhe der AGE-Spiegel und der Abbaumarker wird vermutlich bei der RA nicht primär durch das Alter bestimmt, sondern vielmehr durch den Einfluss der Krankheit selbst.

Das primäre Ziel der Arbeit war es, Zusammenhänge zwischen den AGEs Pentosidin und CML auf der einen und den Abbaumarkern von Knorpel- und Knochengewebe Pyd, DPyd und COMP auf der anderen Seite zu untersuchen. Dabei ergeben sich Resultate von Neuheitswert und weiterführendem Interesse. Die gefundenen Korrelationen, besonders von Pentosidin – Pyd, Pentosidin – DPyd, CML – Crosslink-Quotient, deuten eine pathogenetische Bedeutung der AGE-modifizierten Proteine für die Destruktionsprozesse und die systemische Osteoporose bei der RA an. Ob sich dabei die Veränderungen durch die AGEs, wie aus den vorliegenden Daten vermutet, vor allem auf den Knochenabbau auswirken und in welchem Umfang diese Prozesse bedeutsam sind, bedarf weiterer Abklärung.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Aceves-Avila FJ, Baez-Molgado S, Medina F, Fraga A. 1998. Paleopathology in osseous remains from the 16th century. A survey of rheumatic diseases. *J Rheumatol*, 25 (4):776-782.
- Ahmed MU, Brinkmann Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. 1997. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem J*, 324 (Pt 2):565-570.
- Aletaha D, Smolen J. 2009. Rheumatoide Arthritis : Zielkriterien der Behandlung. *Z Rheumatol*, 68:1-5
- Alvarez-Lafuente R, Fernandez-Gutierrez B, de Miguel S, Jover JA, Rollin R, Loza E, Clemente D, Lamas JR. 2005. Potential relationship between herpes viruses and rheumatoid arthritis: analysis with quantitative real time polymerase chain reaction. *Ann Rheum Dis*, 64 (9):1357-1359.
- Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. 1997. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390 (6656):175-179.
- Aoshima H, Kushida K, Takahashi M, Ohishi T, Hoshino H, Suzuki M, Inoue T. 1998. Circadian variation of urinary type I collagen crosslinked C-telopeptide and free and peptide-bound forms of pyridinium crosslinks. *Bone*, 22 (1):73-78.
- Argirova MD, Breipohl W. 2002. Glycated proteins can enhance photooxidative stress in aged and diabetic lenses. *Free Radic Res*, 36 (12):1251-1259.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 31 (3):315-324.
- Astbury C, Bird HA, McLaren AM, Robins SP. 1994. Urinary excretion of pyridinium crosslinks of collagen correlated with joint damage in arthritis. *Br J Rheumatol*, 33 (1):11-15.
- Auger I, Escola JM, Gorvel JP, Roudier J. 1996. HLA-DR4 and HLA-DR10 motifs that carry susceptibility to rheumatoid arthritis bind 70-kD heat shock proteins. *Nat Med*, 2 (3):306-310.
- Backhaus M, Scheel AK. 2006. Fruhdiagnostik der rheumatoiden Arthritis: Sono und MRT dem Rontgen ubberlegen. *MMW Fortschr Med*, 148 (42):32-35; quiz 36.
- Backhaus M, Sandrock D, Schmidt WA. 2002. Bildgebende Verfahren in der Rheumatologie. *Dtsch Med Wochenschr*, 127 (37):1897-1903.
- Backhaus M, Scheel AK, Burmester GR. 2006. Neue Entwicklungen in der Gelenksonographie. *Z Rheumatol*, 65 (8):700-708.
- Baeten D, Houbiers J, Kruithof E, Vandooren B, Van den Bosch F, Boots AM, Veys EM, Miltenburg AM, De Keyser F. 2006. Synovial inflammation does not change in the absence of effective treatment: implications for the use of synovial histopathology as biomarker in early phase clinical trials in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 65 (8):990-997.

- Baier A, Meineckel I, Gay S, Pap T. 2003. Apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 15 (3):274-279.
- Bailey AJ, Sims TJ, Avery NC, Halligan EP. 1995. Non-enzymic glycation of fibrous collagen: reaction products of glucose and ribose. *Biochem J*, 305 (Pt 2):385-390.
- Bar KJ, Franke S, Wenda B, Muller S, Kientsch-Engel R, Stein G, Sauer H. 2003. Pentosidine and N(epsilon)-(carboxymethyl)-lysine in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurobiol Aging*, 24 (2):333-338.
- Baynes JW. 2001. The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Exp Gerontol*, 36 (9):1527-1537.
- Beardsworth LJ, Eyre DR, Dickson IR. 1990. Changes with age in the urinary excretion of lysyl- and hydroxylysylpyridinoline, two new markers of bone collagen turnover. *J Bone Miner Res*, 5 (7):671-676.
- Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SY, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ, Gregersen PK. 2004. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*, 75 (2):330-337.
- Bernhard J, Villiger PM. 2001. Rheumatoide Arthritis: Pathogenese und Pathologie. *Schweiz Med Forum*, 8:179-183.
- Bernhard J, Ziswiler H-R, Villiger PM. 2001. Rheumatoide Arthritis: Diagnose, Assesment und Qualitätskontrolle. *Schweiz Med Forum*, 8:184-186.
- Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. 1998. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res*, 37 (3):586-600.
- Black D, Duncan A, Robins SP. 1988. Quantitative analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in urine using ion-paired reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 169 (1):197-203.
- Bodolay E, Koch AE, Kim J, Szegedi G, Szekanecz Z. 2002. Angiogenesis and chemokines in rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases. *J Cell Mol Med*, 6 (3):357-376.
- Boissier MC, Assier E, Biton J, Denys A, Falgarone G, Bessis N. 2009. Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 76 (1):10-14.
- Bottcher J, Pfeil A, Mentzel H, Kramer A, Schafer ML, Lehmann G, Eidner T, Petrovitch A, Malich A, Hein G, Kaiser WA. 2006. Peripheral bone status in rheumatoid arthritis evaluated by digital X-ray radiogrammetry and compared with multisite quantitative ultrasound. *Calcif Tissue Int*, 78 (1):25-34.
- Brownlee M. 1992. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care*, 15 (12):1835-1843.
- Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. 1988. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*, 318 (20):1315-1321.

- Bucala R, Model P, Cerami A. 1984. Modification of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81 (1):105-109.
- Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. 1993. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (14):6434-6438.
- Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. 1994. Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91 (20):9441-9445.
- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. 1998. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*, 12 (9):1260-1268.
- Bunn HF, Higgins PJ. 1981. Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science*, 213 (4504):222-224.
- Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. 2006. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci*, 11:529-543.
- Castellani R, Smith MA, Richey PL, Perry G. 1996. Glycooxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. *Brain Res*, 737 (1-2):195-200.
- Chen JR, Takahashi M, Suzuki M, Kushida K, Miyamoto S, Inoue T. 1998. Pentosidine in synovial fluid in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: relationship with disease activity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 25 (12):2440-2444.
- Chen JR, Takahashi M, Suzuki M, Kushida K, Miyamoto S, Inoue T. 1999. Comparison of the concentrations of pentosidine in the synovial fluid, serum and urine of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 38 (12):1275-1278.
- Colaco CA, Ledesma MD, Harrington CR, Avila J. 1996. The role of the Maillard reaction in other pathologies: Alzheimer's disease. *Nephrol Dial Transplant*, 11 Suppl 5:7-12.
- Colwell A, Russell RG, Eastell R. 1993. Factors affecting the assay of urinary 3-hydroxy pyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption. *Eur J Clin Invest*, 23 (6):341-349.
- Colwell A, Hamer A, Blumsohn A, Eastell R. 1996. To determine the effects of ultraviolet light, natural light and ionizing radiation on pyridinium cross-links in bone and urine using high-performance liquid chromatography. *Eur J Clin Invest*, 26 (12):1107-1114.
- Corthay A, Backlund J, Holmdahl R. 2001. Role of glycopeptide-specific T cells in collagen-induced arthritis: an example how post-translational modification of proteins may be involved in autoimmune disease. *Ann Med*, 33 (7):456-465.
- Corthay A, Backlund J, Broddefalk J, Michaelsson E, Goldschmidt TJ, Kihlberg J, Holmdahl R. 1998. Epitope glycosylation plays a critical role for T cell recognition of type II collagen in collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol*, 28 (8):2580-2590.

- Crnkic M, Mansson B, Larsson L, Geborek P, Heinegard D, Saxne T. 2003. Serum cartilage oligomeric matrix protein (COMP) decreases in rheumatoid arthritis patients treated with infliximab or etanercept. *Arthritis Res Ther*, 5 (4):R181-185.
- Dawczynski J, Franke S, Blum M, Kasper M, Stein G, Strobel J. 2002. Advanced glycation end-products in corneas of patients with keratoconus. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 240 (4):296-301.
- DeGroot J, Verzijl N, Bank RA, Lafeber FP, Bijlsma JW, TeKoppele JM. 1999. Age-related decrease in proteoglycan synthesis of human articular chondrocytes: the role of nonenzymatic glycation. *Arthritis Rheum*, 42 (5):1003-1009.
- DeGroot J, Verzijl N, Wenting-Van Wijk MJ, Bank RA, Lafeber FP, Bijlsma JW, TeKoppele JM. 2001a. Age-related decrease in susceptibility of human articular cartilage to matrix metalloproteinase-mediated degradation: the role of advanced glycation end products. *Arthritis Rheum*, 44 (11):2562-2571.
- DeGroot J, Verzijl N, Jacobs KM, Budde M, Bank RA, Bijlsma JW, TeKoppele JM, Lafeber FP. 2001b. Accumulation of advanced glycation endproducts reduces chondrocyte-mediated extracellular matrix turnover in human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 9 (8):720-726.
- Del Campo MT, Gonzalez-Casaus ML, Aguado P, Bernad M, Carrera F, Martinez ME. 1999. Effects of age, menopause and osteoporosis on free, peptide-bound and total pyridinium crosslink excretion. *Osteoporos Int*, 9 (5):449-454.
- Del Rincon I, O'Leary DH, Freeman GL, Escalante A. 2007. Acceleration of atherosclerosis during the course of rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis*, 195 (2):354-360.
- Deutmann R, Bruckner-Tuderman L, Bruckner P. 2003. Binde- und Stützgewebe. In: Löffler G, Petrides P, Hrsg. *Biochemie und Pathobiochemie*. Siebente Aufl. Berlin: Springer-Verlag, 754-787.
- Di Cesare PE, Carlson CS, Stollerman ES, Hauser N, Tulli H, Paulsson M. 1996. Increased degradation and altered tissue distribution of cartilage oligomeric matrix protein in human rheumatoid and osteoarthritic cartilage. *J Orthop Res*, 14 (6):946-955.
- Di Cesare PE, Carlson CS, Stollerman ES, Chen FS, Leslie M, Perris R. 1997. Expression of cartilage oligomeric matrix protein by human synovium. *FEBS Lett*, 412 (1):249-252.
- DiCesare PE, Morgelin M, Mann K, Paulsson M. 1994. Cartilage oligomeric matrix protein and thrombospondin 1. Purification from articular cartilage, electron microscopic structure, and chondrocyte binding. *Eur J Biochem*, 223 (3):927-937.
- Dodge GR, Hawkins D, Boesler E, Sakai L, Jimenez SA. 1998. Production of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) by cultured human dermal and synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage*, 6 (6):435-440.
- Drinda S, Franke S, Ruster M, Petrow P, Pullig O, Stein G, Hein G. 2005. Identification of the receptor for advanced glycation end products in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, 25 (6):411-413.
- Drinda S, Franke S, Canet CC, Petrow P, Brauer R, Huttich C, Stein G, Hein G. 2002. Identification of the advanced glycation end products N(epsilon)-

- carboxymethyllysine in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 61 (6):488-492.
- Eyre DR, Dickson IR, Van Ness K. 1988. Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. *Biochem J*, 252 (2):495-500.
- Fassbender HG. 1998. What destroys the joint in rheumatoid arthritis? *Arch Orthop Trauma Surg*, 117 (1-2):2-7.
- Fatayerji D, Eastell R. 1999. Age-related changes in bone turnover in men. *J Bone Miner Res*, 14 (7):1203-1210.
- Fath R. 2007. Fruhdiagnostik ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie. Rheumapatienten muss man anfassen!. *MMW Fortschr Med*, 149 (4):10-12.
- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. 1996. Rheumatoid arthritis. *Cell*, 85 (3):307-310.
- Firestein GS. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423 (6937):356-361.
- Firestein GS, Zvaifler NJ. 1990. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis Rheum*, 33 (6):768-773.
- Firestein GS, Echeverri F, Yeo M, Zvaifler NJ, Green DR. 1997. Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (20):10895-10900.
- Forslind K, Hafstrom I, Ahlmen M, Svensson B. 2007. Sex: a major predictor of remission in early rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis*, 66 (1):46-52.
- Franke S, Siggelkow H, Wolf G, Hein G. 2007. Advanced glycation endproducts influence the mRNA expression of RAGE, RANKL and various osteoblastic genes in human osteoblasts. *Arch Physiol Biochem*, 113 (3):154-161.
- Franke S, Herrmann D, Hein G, Muller A, Stein G. 1997. Interleukin-6, soluble interleukin-2-receptor and soluble interleukin-6-receptor in sera of patients with rheumatoid arthritis: influences of disease activity and drug therapy. *Eur J Med Res*, 2 (9):401-406.
- Frey O, Petrow PK, Gajda M, Siegmund K, Huehn J, Scheffold A, Hamann A, Radbruch A, Brauer R. 2005. The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4+CD25+ T cells. *Arthritis Res Ther*, 7 (2):R291-301.
- Friedman EA. 1999. Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care*, 22 Suppl 2:B65-71.
- Fujimoto D. 1977. Isolation and characterization of a fluorescent material in bovine achilles tendon collagen. *Biochem Biophys Res Commun*, 76 (4):1124-1129.
- Furumitsu Y, Inaba M, Yukioka K, Yukioka M, Kumeda Y, Azuma Y, Ohta T, Ochi T, Nishizawa Y, Morii H. 2000. Levels of serum and synovial fluid pyridinium crosslinks in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 27 (1):64-70.
- Gabriel SE. 2001. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 27 (2):269-281.
- Gabriel SE, Crowson CS, O'Fallon WM. 1999. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, 1955-1985. *Arthritis Rheum*, 42 (3):415-420.

- Genovese MC, Becker JC, Schiff M, Luggen M, Sherrer Y, Kremer J, Birbara C, Box J, Natarajan K, Nuamah I, Li T, Aranda R, Hagerty DT, Dougados M. 2005. Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. *N Engl J Med*, 353 (11):1114-1123.
- Gerrits MI, Vecht-Hart IM, Oldenhove A, Thijssen JH. 1998. Comparison of urinary bone resorption markers in women of 40-70 years; day-to-day and long-term variation in individual subjects. *Maturitas*, 30 (3):247-255.
- Gough AK, Peel NF, Eastell R, Holder RL, Lilley J, Emery P. 1994. Excretion of pyridinium crosslinks correlates with disease activity and appendicular bone loss in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 53 (1):14-17.
- Grassi W, De Angelis R, Lamanna G, Cervini C. 1998. The clinical features of rheumatoid arthritis. *Eur J Radiol*, 27 Suppl 1:S18-24.
- Gravallese EM. 2002. Bone destruction in arthritis. *Ann Rheum Dis*, 61 Suppl 2:ii84-86.
- Gravallese EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E, Goldring SR. 2000. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum*, 43 (2):250-258.
- Haley RJ, Ward DM. 1986. Nonenzymatically glucosylated serum proteins in patients with end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis*, 8 (2):115-121.
- Haynes DR, Crotti TN, Loric M, Bain GI, Atkins GJ, Findlay DM. 2001. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. *Rheumatology (Oxford)*, 40 (6):623-630.
- Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, Aeschlimann D, Paulsson M, Rosa-Pimentel E, Sommarin Y, Wendel M, Oldberg A, Heinegard D. 1992. Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J Biol Chem*, 267 (9):6132-6136.
- Hein G, Franke S. 2002. Are advanced glycation end-product-modified proteins of pathogenetic importance in fibromyalgia? *Rheumatology (Oxford)*, 41 (10):1163-1167.
- Hein G, Oelzner P, Sprott H, Manger B. 1999. Update Rheumatologie--Teil II. Stand und Perspektiven der Pharmakotherapie chronischer Arthritiden. *Med Klin (Munich)*, 94 (9):485-495.
- Hein G, Eidner G, Eidner T, Marzoll I, Klinner M. 1993. Rheumafaktoraktivitat, Manifestationsalter und rontgenologische Progredienz der rheumatoiden Arthritis (RA)--eine retrospektive Studie. *Z Rheumatol*, 52 (6):403-408.
- Hein G, Wiegand R, Lehmann G, Stein G, Franke S. 2003. Advanced glycation end-products pentosidine and N epsilon-carboxymethyllysine are elevated in serum of patients with osteoporosis. *Rheumatology (Oxford)*, 42 (10):1242-1246.
- Hein G, Franke S, Muller A, Braunig E, Eidner T, Stein G. 1997. The determination of pyridinium crosslinks in urine and serum as a possible marker of cartilage degradation in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*, 16 (2):167-172.
- Hein G, Weiss C, Lehmann G, Niwa T, Stein G, Franke S. 2006. Advanced glycation end product modification of bone proteins and bone remodelling: hypothesis and preliminary immunohistochemical findings. *Ann Rheum Dis*, 65 (1):101-104.

- Hein G, Bolwin R, Brauer R, Eidner T, Franke S, Oelzner P, Sprott H. 1995. Update Rheumatologie--Teil II. Resumee des klinisch bedeutsamen Kenntnisstandes und Ausblick auf perspektivisch relevante Trends in aetiopathogenetischer Forschung, diagnostischen Methoden und therapeutischen Möglichkeiten. *Med Klin (Munich)*, 90 (5):294-302.
- Hein GE. 2001. Pathophysiologie des Knochenverlustes bei rheumatischen Erkrankungen--helfen Knochenmarker beim Monitoring? *Z Rheumatol*, 60 (2):113-115.
- Hein GE. 2006. Glycation endproducts in osteoporosis--is there a pathophysiologic importance? *Clin Chim Acta*, 371 (1-2):32-36.
- Hein GE, Meister M, Oelzner P, Franke S. 2008. sRANKL and OPG in serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis in comparison to non-destructive chronic arthritis. *Rheumatol Int*, 28 (8):765-769.
- Hein GE, Kohler M, Oelzner P, Stein G, Franke S. 2005. The advanced glycation end product pentosidine correlates to IL-6 and other relevant inflammatory markers in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, 26 (2):137-141.
- Hill JA, Southwood S, Sette A, Jevnikar AM, Bell DA, Cairns E. 2003. Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J Immunol*, 171 (2):538-541.
- Hofbauer LC, Heufelder AE. 2001. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med*, 79 (5-6):243-253.
- Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. 1988. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J*, 256 (1):205-212.
- James I, Crowley C, Perrett D. 1993. Assay of pyridinium crosslinks in serum using narrow-bore ion-paired reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 612 (1):41-48.
- Jaradat MI, Schnitzlein-Bick CT, Singh GK, Moe SM. 2001. beta(2)-Microglobulin increases the expression of vascular cell adhesion molecule on human synovial fibroblasts. *Kidney Int*, 59 (5):1951-1959.
- Joosten LA, Lubberts E, Helsen MM, Saxne T, Coenen-de Roo CJ, Heinegard D, van den Berg WB. 1999. Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Res*, 1 (1):81-91.
- Kalousova M, Zima T, Tesar V, Dusilova-Sulkova S, Skrha J. 2005. Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background. *Mutat Res*, 579 (1-2):37-46.
- Kameyama O, Nakahigashi Y, Nakao H, Uejima D, Tsuji H. 2000. Activity of rheumatoid arthritis and urinary pyridinoline and deoxypyridinoline. *J Orthop Sci*, 5 (4):385-389.
- Kampen WU, Voth M, Pinkert J, Krause A. 2007. Therapeutic status of radiosynoviorthesis of the knee with yttrium [90Y] colloid in rheumatoid arthritis and related indications. *Rheumatology (Oxford)*, 46 (1):16-24.
- Kamradt T. 2007. Th17-Zellen. *Z Rheumatol*, 66 (1):54-55.

- Kaufmann J, Mueller A, Voigt A, Carl HD, Gursche A, Zacher J, Stein G, Hein G. 2003. Hydroxypyridinium collagen crosslinks in serum, urine, synovial fluid and synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis compared with osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 42 (2):314-320.
- Kelman A, Lui L, Yao W, Krumme A, Nevitt M, Lane NE. 2006. Association of higher levels of serum cartilage oligomeric matrix protein and N-telopeptide crosslinks with the development of radiographic hip osteoarthritis in elderly women. *Arthritis Rheum*, 54 (1):236-243.
- Kimura T, Ikeda K, Takamatsu J, Miyata T, Sobue G, Miyakawa T, Horiuchi S. 1996. Identification of advanced glycation end products of the Maillard reaction in Pick's disease. *Neurosci Lett*, 219 (2):95-98.
- Klareskog L, Padyukov L, Ronnelid J, Alfredsson L. 2006a. Genes, environment and immunity in the development of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Immunol*, 18 (6):650-655.
- Klareskog L, Ronnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. 2008. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*, 26:651-675.
- Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Kallberg H, Bengtsson C, Grunewald J, Ronnelid J, Harris HE, Ulfgren AK, Rantapaa-Dahlqvist S, Eklund A, Padyukov L, Alfredsson L. 2006b. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum*, 54 (1):38-46.
- Knedla A, Neumann E, Muller-Ladner U. 2007. Developments in the synovial biology field 2006. *Arthritis Res Ther*, 9 (2):209.
- Koch AE. 1998. Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 41 (6):951-962.
- Koehler M. 2005. Untersuchungen zum Nachweis der Advanced Glycation Endproducts (AGEs) Pentosidin und N-Carboxymethyl-Lysin (CML) in Serum und Synovia bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveiras-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. 1999a. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397 (6717):315-323.
- Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, Capparelli C, Li J, Elliott R, McCabe S, Wong T, Campagnuolo G, Moran E, Bogoch ER, Van G, Nguyen LT, Ohashi PS, Lacey DL, Fish E, Boyle WJ, Penninger JM. 1999b. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, 402 (6759):304-309.
- Korb A, Peters M, Meinecke I, Pap T. 2007. Intrazelluläre Signalwege synovialer Fibroblasten bei rheumatoider Arthritis. *Z Rheumatol*, 66 (4):311-316.
- Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, Itonaga I, Fujikawa Y, Athanasou NA. 2003. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone*, 32 (1):1-7.
- Kume S, Kato S, Yamagishi S, Inagaki Y, Ueda S, Arima N, Okawa T, Kojiro M, Nagata K. 2005. Advanced glycation end-products attenuate human

- mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. *J Bone Miner Res*, 20 (9):1647-1658.
- Kummer L. 2007. Einfluss der Pharmakotherapie auf die Kollagen-Crosslinkausscheidung bei rheumatoider Arthritis [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Kushida K, Takahashi M, Kawana K, Inoue T. 1995. Comparison of markers for bone formation and resorption in premenopausal and postmenopausal subjects, and osteoporosis patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 80 (8):2447-2450.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. 1998. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93 (2):165-176.
- Larsson E, Mussener A, Heinegard D, Klareskog L, Saxne T. 1997. Increased serum levels of cartilage oligomeric matrix protein and bone sialoprotein in rats with collagen arthritis. *Br J Rheumatol*, 36 (12):1258-1261.
- Ligier S, Fortin PR, Newkirk MM. 1998. A new antibody in rheumatoid arthritis targeting glycosylated IgG: IgM anti-IgG-AGE. *Br J Rheumatol*, 37 (12):1307-1314.
- Lineker S, Badley E, Charles C, Hart L, Streiner D. 1999. Defining morning stiffness in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 26 (5):1052-1057.
- Liu CJ, Kong W, Xu K, Luan Y, Ilalov K, Sehgal B, Yu S, Howell RD, Di Cesare PE. 2006a. ADAMTS-12 associates with and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *J Biol Chem*, 281 (23):15800-15808.
- Liu CJ, Kong W, Ilalov K, Yu S, Xu K, Prazak L, Fajardo M, Sehgal B, Di Cesare PE. 2006b. ADAMTS-7: a metalloproteinase that directly binds to and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *Faseb J*, 20 (7):988-990.
- Lucey MD, Newkirk MM, Neville C, Lepage K, Fortin PR. 2000. Association between IgM response to IgG damaged by glyoxidation and disease activity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 27 (2):319-323.
- Lunec J, Blake DR. 1985. The determination of dehydroascorbic acid and ascorbic acid in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Free Radic Res Commun*, 1 (1):31-39.
- MacDonald AG, Birkinshaw G, Durham B, Bucknall RC, Fraser WD. 1997. Biochemical markers of bone turnover in seronegative spondylarthropathy: relationship to disease activity. *Br J Rheumatol*, 36 (1):50-53.
- Makarov SS. 2001. NF-kappa B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. *Arthritis Res*, 3 (4):200-206.
- Makino H, Shikata K, Kushiro M, Hironaka K, Yamasaki Y, Sugimoto H, Ota Z, Araki N, Horiuchi S. 1996. Roles of advanced glycation end-products in the progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 11 Suppl 5:76-80.
- Makita Z, Yanagisawa K, Kuwajima S, Bucala R, Vlassara H, Koike T. 1996. The role of advanced glycosylation end-products in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*, 11 Suppl 5:31-33.

- Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, Friedman EA, Cerami A, Vlassara H. 1991. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med*, 325 (12):836-842.
- Manicourt DH, Poilvache P, Van Egeren A, Devogelaer JP, Lenz ME, Thonar EJ. 2000. Synovial fluid levels of tumor necrosis factor alpha and oncostatin M correlate with levels of markers of the degradation of crosslinked collagen and cartilage aggrecan in rheumatoid arthritis but not in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 43 (2):281-288.
- Mansson B, Geborek P, Saxne T. 1997. Cartilage and bone macromolecules in knee joint synovial fluid in rheumatoid arthritis: relation to development of knee or hip joint destruction. *Ann Rheum Dis*, 56 (2):91-96.
- Mansson B, Gulfe A, Geborek P, Heinegard D, Saxne T. 2001. Release of cartilage and bone macromolecules into synovial fluid: differences between psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 60 (1):27-31.
- Mansson B, Carey D, Alini M, Ionescu M, Rosenberg LC, Poole AR, Heinegard D, Saxne T. 1995. Cartilage and bone metabolism in rheumatoid arthritis. Differences between rapid and slow progression of disease identified by serum markers of cartilage metabolism. *J Clin Invest*, 95 (3):1071-1077.
- Maradit-Kremers H, Crowson CS, Nicola PJ, Ballman KV, Roger VL, Jacobsen SJ, Gabriel SE. 2005. Increased unrecognized coronary heart disease and sudden deaths in rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *Arthritis Rheum*, 52 (2):402-411.
- Marti C, Neidhart M, Gerber T, Hauser N, Michel BA, Hauselmann HJ. 1999. Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP): Die Rolle eines nichtkollagenen Knorpel-Matrix-Proteins als Marker der Krankheitsaktivität und Gelenkzerstörung bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und Arthrose. *Z Rheumatol*, 58 (2):79-87.
- McCachren SS. 1991. Expression of metalloproteinases and metalloproteinase inhibitor in human arthritic synovium. *Arthritis Rheum*, 34 (9):1085-1093.
- McCarthy AD, Etcheverry SB, Cortizo AM. 1999. Advanced glycation endproduct-specific receptors in rat and mouse osteoblast-like cells: regulation with stages of differentiation. *Acta Diabetol*, 36 (1-2):45-52.
- McCarthy AD, Etcheverry SB, Bruzzone L, Lettieri G, Barrio DA, Cortizo AM. 2001. Non-enzymatic glycosylation of a type I collagen matrix: effects on osteoblastic development and oxidative stress. *BMC Cell Biol*, 2:16.
- Meinecke I, Pap T. 2006. Rheumatoide Arthritis - T-Zell-unabhängige Mechanismen. *Akt Rheumatol*, 31:41-47.
- Meinecke I, Cinski A, Baier A, Peters MA, Dankbar B, Wille A, Drynda A, Mendoza H, Gay RE, Hay RT, Ink B, Gay S, Pap T. 2007. Modification of nuclear PML protein by SUMO-1 regulates Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (12):5073-5078.
- Melchers I, Ahnert P. 2008. Zur Bedeutung der Genvariante PTPN22 620W für die Rheumatologie. *Z Rheumatol*, 67 (7):593-595.
- Miyata T, Kawai R, Taketomi S, Sprague SM. 1996a. Possible involvement of advanced glycation end-products in bone resorption. *Nephrol Dial Transplant*, 11 Suppl 5:54-57.

- Miyata T, Iida Y, Horie K, Cai Z, Sugiyama S, Maeda K. 1996b. Pathophysiology of advanced glycation end-products in renal failure. *Nephrol Dial Transplant*, 11 Suppl 5:27-30.
- Miyata T, Notoya K, Yoshida K, Horie K, Maeda K, Kurokawa K, Taketomi S. 1997. Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. *J Am Soc Nephrol*, 8 (2):260-270.
- Miyata T, Ishiguro N, Yasuda Y, Ito T, Nangaku M, Iwata H, Kurokawa K. 1998. Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers. *Biochem Biophys Res Commun*, 244 (1):45-49.
- Miyata T, Inagi R, Iida Y, Sato M, Yamada N, Oda O, Maeda K, Seo H. 1994. Involvement of beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis. Induction of human monocyte chemotaxis and macrophage secretion of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *J Clin Invest*, 93 (2):521-528.
- Miyata T, Ueda Y, Shinzato T, Iida Y, Tanaka S, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Maeda K. 1996c. Accumulation of albumin-linked and free-form pentosidine in the circulation of uremic patients with end-stage renal failure: renal implications in the pathophysiology of pentosidine. *J Am Soc Nephrol*, 7 (8):1198-1206.
- Moe SM, Singh GK, Bailey AM. 2000. beta2-microglobulin induces MMP-1 but not TIMP-1 expression in human synovial fibroblasts. *Kidney Int*, 57 (5):2023-2034.
- Momohara S, Yamanaka H, Holledge MM, Mizumura T, Ikari K, Okada N, Kamatani N, Tomatsu T. 2004. Cartilage oligomeric matrix protein in serum and synovial fluid of rheumatoid arthritis: potential use as a marker for joint cartilage damage. *Mod Rheumatol*, 14 (5):356-360.
- Mora S, Pitukcheewanont P, Kaufman FR, Nelson JC, Gilsanz V. 1999. Biochemical markers of bone turnover and the volume and the density of bone in children at different stages of sexual development. *J Bone Miner Res*, 14 (10):1664-1671.
- Mullan RH, Bresnihan B. 2003. Disease-modifying anti-rheumatic drug therapy and structural damage in early rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 21 (5 Suppl 31):S158-164.
- Muller A, Jakob K, Hein GE. 2003. Evaluation of free and peptide bound collagen crosslink excretion in different skeletal diseases. *Ann Rheum Dis*, 62 (1):65-67.
- Muller A, Stein G, Lehmann G, Hein G. 1999. Investigations of bone turnover in renal osteopathy. *Eur J Med Res*, 4 (2):78-84.
- Muller A, Hein G, Franke S, Herrmann D, Henzgen S, Roth A, Stein G. 1996. Quantitative analysis of pyridinium crosslinks of collagen in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis using high-performance liquid chromatography. *Rheumatol Int*, 16 (1):23-28.
- Muller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, Gay S. 1996. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol*, 149 (5):1607-1615.

- Nagai M, Kyakumoto S, Sato N. 2000. Cancer cells responsible for humoral hypercalcemia express mRNA encoding a secreted form of ODF/TRANCE that induces osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 269 (2):532-536.
- Nagaraj RH, Sell DR, Prabhakaram M, Ortwerth BJ, Monnier VM. 1991. High correlation between pentosidine protein crosslinks and pigmentation implicates ascorbate oxidation in human lens senescence and cataractogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (22):10257-10261.
- Nawroth PP, Bierhaus A, Vogel GE, Hofmann MA, Zumbach M, Wahl P, Ziegler R. 1999. Nichtenzymatische Glykierung und oxidativer Stress bei chronischen Erkrankungen und Diabetes mellitus. *Med Klin (Munich)*, 94 (1):29-38.
- Neidhart M, Hauser N, Paulsson M, DiCesare PE, Michel BA, Hauselmann HJ. 1997. Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. *Br J Rheumatol*, 36 (11):1151-1160.
- Nell VP, Machold KP, Stamm TA, Eberl G, Heinzl H, Uffmann M, Smolen JS, Steiner G. 2005. Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 64 (12):1731-1736.
- Nell-Duxneuner V, Machold K, Stamm T, Eberl G, Heinzl H, Hoeffler E, Smolen JS, Steiner G. 2009. Autoantibody profiling in patients with very early rheumatoid arthritis - a follow-up study. *Ann Rheum Dis*, published online 19 Jan 2009;doi:10.1136/ard.2008.100677
- Nepom GT, Byers P, Seyfried C, Healey LA, Wilske KR, Stage D, Nepom BS. 1989. HLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis Rheum*, 32 (1):15-21.
- Newkirk MM, LePage K, Niwa T, Rubin L. 1998. Advanced glycation endproducts (AGE) on IgG, a target for circulating antibodies in North American Indians with rheumatoid arthritis (RA). *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 44 (7):1129-1138.
- Oelzner P, Franke S, Muller A, Hein G, Stein G. 1999. Relationship between soluble markers of immune activation and bone turnover in post-menopausal women with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 38 (9):841-847.
- Oelzner P, Franke S, Lehmann G, Eidner T, Muller A, Wolf G, Hein G. 2007. Soluble receptor activator of NFkappa B-ligand and osteoprotegerin in rheumatoid arthritis - relationship with bone mineral density, disease activity and bone turnover. *Clin Rheumatol*, 26 (12):2127-2135.
- Ogawa T, Ono T, Tsuda M, Kawanishi Y. 1982. A novel fluor in insoluble collagen: a crosslinking moiety in collagen molecule. *Biochem Biophys Res Commun*, 107 (4):1252-1257.
- Ohishi T, Takahashi M, Kawana K, Aoshima H, Hoshino H, Horiuchi K, Kushida K, Inoue T. 1993. Age-related changes of urinary pyridinoline and deoxypyridinoline in Japanese subjects. *Clin Invest Med*, 16 (5):319-325.
- Okazaki Y, Tsurukami H, Nishida S, Okimoto N, Aota S, Takeda S, Nakamura T. 1998. Prednisolone prevents decreases in trabecular bone mass and strength by reducing bone resorption and bone formation defect in adjuvant-induced arthritic rats. *Bone*, 23 (4):353-360.

- Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegard D. 1992. COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. *J Biol Chem*, 267 (31):22346-22350.
- Pap T. 2007. Regulation des programmierten Zelltod in aggressiven Fibroblasten. *Z Rheumatol*, 66 (3):239-240, 242.
- Pap T, Muller-Ladner U, Gay RE, Gay S. 2000. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 2 (5):361-367.
- Pearce D, Fisher E, Randall A, Will R, Kent GN, Garcia-Webb P. 1995. Urinary levels of Pyridinoline and deoxypyridinoline may be influenced by turnover of non-osseous tissues in patients with joint disease. *Br J Rheumatol*, 34 (12):1186-1187.
- Pfeil A, Bottcher J, Mentzel HJ, Lehmann G, Schafer ML, Kramer A, Petrovitch A, Seidl BE, Malich A, Hein G, Wolf G, Kaiser WA. 2006. Multi-site quantitative ultrasound compared to dual energy X-ray absorptiometry in rheumatoid arthritis: effects of body mass index and inflamed soft tissue on reproducibility. *Rheumatol Int*, 26 (12):1084-1090.
- Pincus T, Ferraccioli G, Sokka T, Larsen A, Rau R, Kushner I, Wolfe F. 2002. Evidence from clinical trials and long-term observational studies that disease-modifying anti-rheumatic drugs slow radiographic progression in rheumatoid arthritis: updating a 1983 review. *Rheumatology (Oxford)*, 41 (12):1346-1356.
- Rannou F, Francois M, Corvol MT, Berenbaum F. 2006. Cartilage breakdown in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*, 73 (1):29-36.
- Raptopoulou A, Sidiropoulos P, Katsouraki M, Boumpas DT. 2007. Anti-citrulline antibodies in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis: evolving concepts. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 44 (4):339-363.
- Recklies AD, Baillargeon L, White C. 1998. Regulation of cartilage oligomeric matrix protein synthesis in human synovial cells and articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 41 (6):997-1006.
- Robins SP, Black D, Paterson CR, Reid DM, Duncan A, Seibel MJ. 1991. Evaluation of urinary hydroxypyridinium crosslink measurements as resorption markers in metabolic bone diseases. *Eur J Clin Invest*, 21 (3):310-315.
- Rodriguez-Garcia J, Requena JR, Rodriguez-Segade S. 1998. Increased concentrations of serum pentosidine in rheumatoid arthritis. *Clin Chem*, 44 (2):250-255.
- Romas E, Bakharevski O, Hards DK, Kartsogiannis V, Quinn JM, Ryan PF, Martin TJ, Gillespie MT. 2000. Expression of osteoclast differentiation factor at sites of bone erosion in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 43 (4):821-826.
- Rothschild BM, Woods RJ, Rothschild C, Sebes JJ. 1992. Geographic distribution of rheumatoid arthritis in ancient North America: implications for pathogenesis. *Semin Arthritis Rheum*, 22 (3):181-187.
- Roudier J, Rhodes G, Petersen J, Vaughan JH, Carson DA. 1988. The Epstein-Barr virus glycoprotein gp110, a molecular link between HLA DR4, HLA DR1, and rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol*, 27 (4):367-371.
- Ruster M, Franke S, Spath M, Pongratz DE, Stein G, Hein GE. 2005. Detection of elevated N epsilon-carboxymethyllysine levels in muscular tissue and in serum of patients with fibromyalgia. *Scand J Rheumatol*, 34 (6):460-463.

- Rutz S, Scheffold A. 2008. Selbstlimitation entzündlicher T-Zell-Antworten. Hilfe zur Selbsthilfe als therapeutisches Konzept. *Z Rheumatol*, 67 (6):500-502.
- Saag KG, Teng GG, Patkar NM, Anuntiyo J, Finney C, Curtis JR, Paulus HE, Mudano A, Pisu M, Elkins-Melton M, Outman R, Allison JJ, Suarez Almazor M, Bridges SL, Jr., Chatham WW, Hochberg M, MacLean C, Mikuls T, Moreland LW, O'Dell J, Turkiewicz AM, Furst DE. 2008. American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 59 (6):762-784.
- Sajithlal GB, Chithra P, Chandrakasan G. 1999. An in vitro study on the role of metal catalyzed oxidation in glycation and crosslinking of collagen. *Mol Cell Biochem*, 194 (1-2):257-263.
- Saudek DM, Kay J. 2003. Advanced glycation endproducts and osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep*, 5 (1):33-40.
- Sauerland U, Becker H, Seidel M, Schotte H, Willeke P, Schorat A, Schluter B, Domschke W, Gaubitz M. 2005. Clinical utility of the anti-CCP assay: experiences with 700 patients. *Ann N Y Acad Sci*, 1050:314-318.
- Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. 2001. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest*, 108 (7):949-955.
- Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D. 1994. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb*, 14 (10):1521-1528.
- Schmidt-Gayk H. 1996. Labordiagnostik bei metabolischer Osteopathie. *Med Klin (Munich)*, 91 Suppl 1:38-39.
- Seibel MJ, Duncan A, Robins SP. 1989. Urinary hydroxy-pyridinium crosslinks provide indices of cartilage and bone involvement in arthritic diseases. *J Rheumatol*, 16 (7):964-970.
- Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP. 1992. Urinary pyridinium crosslinks of collagen Specific markers of bone resorption in metabolic bone disease. *Trends Endocrinol Metab*, 3 (7):263-270.
- Seidel W, Hecker M, Wagner U, Hantzschel H. 2006. Rheumatoide Arthritis und kardiovaskuläre Komplikationen. *Z Rheumatol*, 65 (6):482, 484-486.
- Sharma PK, Hota D, Pandhi P. 2004. Biologics in rheumatoid arthritis. *J Assoc Physicians India*, 52:231-236.
- Short CL. 1974. The antiquity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 17 (3):193-205.
- Silverman GJ, Carson DA. 2003. Roles of B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 5 Suppl 4:S1-6.
- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89 (2):309-319.

- Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. 2001. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 44 (2):129-146.
- Sinigaglia L, Varenna M, Binelli L, Bartucci F, Arrigoni M, Ferrara R, Abbiati G. 1995. Urinary and synovial pyridinium crosslink concentrations in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 54 (2):144-147.
- Skoumal M, Kolarz G, Klingler A. 2003. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein. A predicting factor and a valuable parameter for disease management in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, 32 (3):156-161.
- Skoumal M, Kolarz G, Haberhauer G, Woloszczuk W, Hawa G, Klingler A. 2005. Osteoprotegerin and the receptor activator of NF-kappa B ligand in the serum and synovial fluid. A comparison of patients with longstanding rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatol Int*, 26 (1):63-69.
- Skoumal M, Haberhauer G, Feyertag J, Kittl EM, Bauer K, Dunky A. 2006. Serum levels of cartilage oligomeric matrix protein (COMP): a rapid decrease in patients with active rheumatoid arthritis undergoing intravenous steroid treatment. *Rheumatol Int*, 26 (11):1001-1004.
- Smit AJ, Lutgers HL. 2004. The clinical relevance of advanced glycation endproducts (AGE) and recent developments in pharmaceuticals to reduce AGE accumulation. *Curr Med Chem*, 11 (20):2767-2784.
- Smolen JS, Aletaha D, Grisar J, Redlich K, Steiner G, Wagner O. 2008. The need for prognosticators in rheumatoid arthritis. Biological and clinical markers: where are we now? *Arthritis Res Ther*, 10 (3):208.
- Smolen JS, Van Der Heijde DM, St Clair EW, Emery P, Bathon JM, Keystone E, Maini RN, Kalden JR, Schiff M, Baker D, Han C, Han J, Bala M. 2006. Predictors of joint damage in patients with early rheumatoid arthritis treated with high-dose methotrexate with or without concomitant infliximab: results from the ASPIRE trial. *Arthritis Rheum*, 54 (3):702-710.
- Smulders RA, Stehouwer CD, Schalkwijk CG, Donker AJ, van Hinsbergh VW, TeKoppele JM. 1998. Distinct associations of HbA1c and the urinary excretion of pentosidine, an advanced glycosylation end-product, with markers of endothelial function in insulin-dependent diabetes mellitus. *Thromb Haemost*, 80 (1):52-57.
- Steinman L. 2007. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*, 13 (2):139-145.
- Suarez G, Rajaram R, Oronsky AL, Gawinowicz MA. 1989. Nonenzymatic glycation of bovine serum albumin by fructose (fructation). Comparison with the Maillard reaction initiated by glucose. *J Biol Chem*, 264 (7):3674-3679.
- Symmons DP, Barrett EM, Bankhead CR, Scott DG, Silman AJ. 1994. The incidence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: results from the Norfolk Arthritis Register. *Br J Rheumatol*, 33 (8):735-739.
- Szkudlarek M, Klarlund M, Narvestad E, Court-Payen M, Strandberg C, Jensen KE, Thomsen HS, Ostergaard M. 2006. Ultrasonography of the metacarpophalangeal and proximal interphalangeal joints in rheumatoid arthritis: a comparison with magnetic resonance imaging, conventional radiography and clinical examination. *Arthritis Res Ther*, 8 (2):R52.

- Takahashi M, Oikawa M, Nagano A. 2000. Effect of age and menopause on serum concentrations of pentosidine, an advanced glycation end product. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 55 (3):M137-140.
- Takahashi M, Hoshino H, Kushida K, Inoue T. 1995. Direct measurement of crosslinks, pyridinoline, deoxypyridinoline, and pentosidine, in the hydrolysate of tissues using high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem*, 232 (2):158-162.
- Takahashi M, Suzuki M, Kushida K, Miyamoto S, Inoue T. 1997. Relationship between pentosidine levels in serum and urine and activity in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*, 36 (6):637-642.
- Takahashi M, Suzuki M, Naitou K, Miyamoto S, Kushida K. 1999. Comparison of free and peptide-bound pyridinoline cross-links excretion in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 38 (2):133-138.
- Takahashi M, Kushida K, Ohishi T, Kawana K, Hoshino H, Uchiyama A, Inoue T. 1994. Quantitative analysis of crosslinks pyridinoline and pentosidine in articular cartilage of patients with bone and joint disorders. *Arthritis Rheum*, 37 (5):724-728.
- Takahashi M, Kushida K, Hoshino H, Suzuki M, Sano M, Miyamoto S, Inoue T. 1996. Concentrations of pyridinoline and deoxypyridinoline in joint tissues from patients with osteoarthritis or rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 55 (5):324-327.
- Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T, Koshihara Y, Oda H, Nakamura K, Tanaka S. 2000. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43 (2):259-269.
- Tengstrand B, Ahlmen M, Hafstrom I. 2004. The influence of sex on rheumatoid arthritis: a prospective study of onset and outcome after 2 years. *J Rheumatol*, 31 (2):214-222.
- Thom R. 2008. Untersuchungen zu biologischen Markern des Skelettmetabolismus in der Synovialflüssigkeit bei Rheumatoider Arthritis [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Thomas N, Morris HA, Scopacasa F, Wishart JM, Need AG. 1999. Relationships between age, dehydro-epiandrosterone sulphate and plasma glucose in healthy men. *Age Ageing*, 28 (2):217-220.
- Thornalley PJ. 1998. Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 44 (7):1013-1023.
- Uebelhart D, Schlemmer A, Johansen JS, Gineyts E, Christiansen C, Delmas PD. 1991. Effect of menopause and hormone replacement therapy on the urinary excretion of pyridinium cross-links. *J Clin Endocrinol Metab*, 72 (2):367-373.
- Verhoeven AC, Boers M, te Koppele JM, van der Laan WH, Markusse HM, Geusens P, van der Linden S. 2001. Bone turnover, joint damage and bone mineral density in early rheumatoid arthritis treated with combination therapy including high-dose prednisolone. *Rheumatology (Oxford)*, 40 (11):1231-1237.

- Verzijl N, DeGroot J, Bank RA, Bayliss MT, Bijlsma JW, Lafeber FP, Maroudas A, TeKoppele JM. 2001. Age-related accumulation of the advanced glycation endproduct pentosidine in human articular cartilage aggrecan: the use of pentosidine levels as a quantitative measure of protein turnover. *Matrix Biol*, 20 (7):409-417.
- Verzijl N, DeGroot J, Thorpe SR, Bank RA, Shaw JN, Lyons TJ, Bijlsma JW, Lafeber FP, Baynes JW, TeKoppele JM. 2000. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem*, 275 (50):39027-39031.
- Verzijl N, DeGroot J, Ben ZC, Brau-Benjamin O, Maroudas A, Bank RA, Mizrahi J, Schalkwijk CG, Thorpe SR, Baynes JW, Bijlsma JW, Lafeber FP, TeKoppele JM. 2002. Crosslinking by advanced glycation end products increases the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: a possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 46 (1):114-123.
- Vilim V, Lenz ME, Vytasek R, Masuda K, Pavelka K, Kuettner KE, Thonar EJ. 1997. Characterization of monoclonal antibodies recognizing different fragments of cartilage oligomeric matrix protein in human body fluids. *Arch Biochem Biophys*, 341 (1):8-16.
- Vlassara H. 1996. Advanced glycation end-products and atherosclerosis. *Ann Med*, 28 (5):419-426.
- Vlassara H, Palace MR. 2002. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med*, 251 (2):87-101.
- Vogt T, Regenass S, Schlumpf A, Tyndall A. 2006. Autoantikörper in der Rheumatologie. *Schweiz Med Forum*, 6:977-980.
- Walakovits LA, Moore VL, Bhardwaj N, Gallick GS, Lark MW. 1992. Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury. *Arthritis Rheum*, 35 (1):35-42.
- Wang X, Shen X, Li X, Agrawal CM. 2002. Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone*, 31 (1):1-7.
- Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. 2007. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol*, 25:821-852.
- Wedler K. 2006. Natürliche Kollagencrosslinks und Advanced Glycation Endproducts (AGEs) bei rheumatoider Arthritis und Arthritis psoriatica [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Weitoft T, Larsson A, Saxne T, Ronnblom L. 2005. Changes of cartilage and bone markers after intra-articular glucocorticoid treatment with and without postinjection rest in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 64 (12):1750-1753.
- Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW. 1995. Mechanism of autooxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autooxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry*, 34 (11):3702-3709.
- Wernicke D, Voigt A, Muller A, Schmidt WA, Stiehl P, Hein G. 2008. Assoziation zwischen dem histopathologischen Synovialitis-Typ II und einem erhöhten

- Pyridinolin-Gehalt im Synovialgewebe bei rheumatoider Arthritis. *Z Rheumatol*, 67 (3):225-231.
- Westhoff G, Zink A. 2007. Basistherapie bei fruher rheumatoider Arthritis. Verzicht auf rheumatologische Mitbetreuung und Praferenz fur Alternativmedizin erhohen das Risiko einer Unterversorgung. *Z Rheumatol*, 66 (2):121-124, 126-128.
- Weyand CM, Hicok KC, Conn DL, Goronzy JJ. 1992. The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*, 117 (10):801-806.
- Wilson C, Tiwana H, Ebringer A. 2000. Molecular mimicry between HLA-DR alleles associated with rheumatoid arthritis and *Proteus mirabilis* as the Aetiological basis for autoimmunity. *Microbes Infect*, 2 (12):1489-1496.
- Wisotzky J, Sommer M, Schubert K, Stein G. 1996. Die Akkumulation von AGE im Alterungsprozess, bei Diabetes mellitus und bei der chronischen Niereninsuffizienz. *Med Klin (Munich)*, 91 (7):454-457.
- Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS, 3rd, Frankel WN, Lee SY, Choi Y. 1997. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem*, 272 (40):25190-25194.
- Yamamoto T, Ozono K, Miyauchi A, Kasayama S, Kojima Y, Shima M, Okada S. 2001. Role of advanced glycation end products in adynamic bone disease in patients with diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis*, 38 (4 Suppl 1):S161-164.
- Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. 1994. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem*, 269 (13):9889-9897.
- Zaia J, Boynton RE, McIntosh A, Marshak DR, Olsson H, Heinegard D, Barry FP. 1997. Post-translational modifications in cartilage oligomeric matrix protein. Characterization of the N-linked oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Biol Chem*, 272 (22):14120-14126.
- Zink A, Gromnica-Ihle E. 2006. "Nicht-Rauchen"--ein bestätigter Faktor zur Primarprvention der rheumatoiden Arthritis. *Z Rheumatol*, 65 (5):424-426.
- Ziswiler H-R, Villiger PM. 2001. Rheumatoide Arthritis: medikamentöse Therapie. *Schweiz Med Forum*, 8:187-191.

9 Anhang

9.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname: Scharf, Christiane
Geburtsdatum: 03.12.1983
Geburtsort: Gera
Wohnort: 07616 Petersberg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

09/90 – 08/94 Staatliche Grundschule Hainspitz
09/94 – 08/02 Friedrich-Schiller-Gymnasium Eisenberg
06/02 Abitur

Studium der Humanmedizin

10/02 – 09/04 Vorklinik an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/04 Ärztliche Vorprüfung
10/04 – 03/09 Klinik an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
12/08 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit

ab 06/09 Ärztin in Weiterbildung Innere Medizin am Sophien- und
Hufeland-Klinikum Weimar

Petersberg, 23.05.2009

.....
Unterschrift des Verfassers

9.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. habil. G. E. Hein für die Überlassung des Themas sowie für die wissenschaftliche Anleitung und fürsorgliche Betreuung.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Frau PD Dr. rer. nat. S. Franke und Dr. rer. nat. A. Müller für die Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der labortechnischen Untersuchungen, ebenso bei dem gesamten Team des rheumatologischen Labors.

Ein Dank gilt auch Frau K. Scheibe, die mich jederzeit freundlich unterstützte, wenn ich Prof. Hein wegen der Promotion kontaktierte.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei T. und C. Fiedler, die sich die Mühe machten, meine Promotion zu lesen und auf manche Fehler und Unverständlichkeiten hinwiesen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, insbesondere meinen lieben Eltern und meinem Freund, ohne deren Verständnis und Unterstützung diese Arbeit sicherlich nicht zum Abschluss gekommen wäre.

9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. med. habil. G. E. Hein, Frau PD Dr. rer. nat. S. Franke und Herr Dr. rer. nat. A. Müller,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Petersberg, 23.05.2009

.....

Unterschrift des Verfassers